

на правах рукописи

ГЮНТЕР ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА
КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РАСТЕНИЙ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Сыктывкар - 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

Научные консультанты: академик РАН,
доктор химических наук, профессор
Оводов Юрий Семенович

доктор биологических наук, доцент
Попов Сергей Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник ФГБУН
Института биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН.
Игнатов Владимир Владимирович

чл.-корр. РАН,
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией ФГБУН
Института органической и физической химии
им. А.Е.Арбузова Казанского научного центра РАН
Миронов Владимир Федорович

доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник ФГБУН
Казанского Института биохимии и
биофизики Казанского научного центра РАН.
Чиков Владимир Иванович

Ведущая организация: ФГБУН Институт физиологии растений РАН

Защита состоится «__» _____ 201__ г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского (Приволжского) федерального университета.

Автореферат разослан «__» _____ 201__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Пектиновые вещества относятся к большой группе гликаногалактуронанов и включают протопектин, пектиновые полисахариды (гомогалактуронан, рамногалактуронаны I и II (RG-I и RG-II), ксилогалактуронан и апиогалактуронан) и сопутствующие арабинаны, галактаны и арабиногалактаны (Оводов, 2009). Пектиновые вещества входят в состав клеточных стенок практически всех высших наземных и водных растений и выполняют важные биологические функции: обеспечивают ионный транспорт и водный режим, влияют на прорастание семян, рост и развитие растения, обеспечивают их засухоустойчивость и морозостойкость, выполняют защитную роль во взаимоотношениях растения с фитопатогенами (Mohnen, 2008; Оводов и др., 2009). Известно, что биологические функции и физиологическая активность растительных полисахаридов определяются особенностями их строения (Wagner et al., 1988; Roesler et al., 1991; Оводов, 2009).

Закономерности формирования пектиновых макромолекул в ходе биосинтеза и постсинтетической модификации в растительной ткани изучены недостаточно. Это связано, в первую очередь, со сложностью анализа клеточных стенок нативных растений, представляющих собой многокомпонентные и динамичные структуры (Горшкова, 2007). Как изучение процессов биохимического обеспечения функций клеточных стенок, так и получение физиологически активных и технически ценных пектиновых полисахаридов целесообразно проводить с использованием клеточных культур. Культура клеток растений, состоящая в основном из клеток с первичными клеточными стенками, представляет интерес как биологическая система, позволяющая прояснить процессы первичного метаболизма в культивируемых клетках, влияние на них трофических, гормональных и физических факторов, действие карбогидразных ферментов, выявить гены, участвующие в регуляции биосинтеза полисахаридов. Пектиновые вещества культур клеток частично изучены. В частности, гомогалактуронаны и RG-I клеточных стенок суспензионных культур явора (McNeil et al., 1984), риса (Thomas et al., 1989), криптомерии (Edashige and Ishii, 1996), картофеля (Pauly and Scheller, 2000), тополя (Kakegawa et al., 2000); RG-II и арабиногалактаны культур явора (McNeil et al., 1984), табака (Matoh et al., 2000) и др. Однако не известно, как отличаются пектины нативных растений и каллусных клеток. При незначительном количестве работ по сравнительному изучению пектиновых веществ культур клеток и нативных растений приводятся данные как о сходстве (Blaschek and Franz, 1983; Edashige and Ishii, 1996), так и о различиях в их составе (Stoddart et al., 1967; Wagner et al., 1988).

По современным представлениям растительная клеточная стенка является динамичной сложноорганизованной системой, состав которой может изменяться во время роста и дифференциации клеток, а также под влиянием внешних факторов (Carpita, 1993; Konno et al., 1999; Горшкова, 2007; McLeod et al., 2008). Изменения, происходящие в клеточной стенке, обусловлены наличием в ней большого количества ферментов, в первую очередь гидролаз, к которым относятся гликаназы и эстеразы (Fry, 1995; Minic, 2008). В этой связи, структура пектиновых веществ, формирующих гелевую фазу в матриксе клеточной стенки, может существенно изменяться. Известно, что строение боковых цепей пектина важно для архитектуры клеточной стенки, а небольшие изменения реологических свойств мат-

рикса имеют последствия для биофизических свойств клеточной стенки (Sørensen et al., 2000; Iwai et al., 2001).

Данные по влиянию абиотических и биотических факторов, в том числе экстремальных, на содержание и строение пектиновых веществ клеточной стенки растения крайне малочисленны. Не известно как реагирует на эти воздействия матрикс клеточной стенки, в частности, как изменяются основные структурные характеристики пектиновых макромолекул. Не исключается возможность того, что стрессовые факторы по-разному влияют на синтез полисахаридов матрикса и происходит изменение метаболизации отдельных полимеров клеточной стенки. Установлено, что клеточная стенка может являться источником сигналов для запуска ответных реакций растительного организма (Горшкова, 2007).

Можно предположить, что одним из составляющих механизма реагирования растительной клетки на абиотические и биотические факторы является постсинтетическая модификация пектиновых веществ клеточной стенки, что, вероятно, является частью адаптационной программы растений, подвергшихся воздействию неблагоприятных факторов. Такого рода исследования актуальны для выявления механизмов функционирования клеточной стенки, в частности, устойчивости к неблагоприятным воздействиям среды, а также выяснения молекулярных механизмов реагирования клеточных компонентов и живых организмов на экстремальные воздействия.

Актуальность исследования усиливается в связи с тем, что модификация пектиновых веществ культур клеток растений под действием различных факторов может служить одним из подходов для получения полисахаридов с заданным строением и свойствами. Принципиально важным представляется выяснение влияния ферментов, трофических и гормональных факторов, ультрафиолета и фитопатогенных грибов на молекулярный вес, содержание остатков арабинозы и галактозы в боковых углеводных цепях пектинов и степень метилэтерифицирования пектинов. Известно, что именно от данных особенностей зависит физиологическая активность пектинов (Попов, 2010). Разработка способов направленной модуляции активности ферментов клеточной стенки открывает перспективу целенаправленного получения полисахаридов с конкретными ценными свойствами и заданной структурой, что может иметь прикладное значение.

Настоящая работа выполнена с использованием культур клеток лекарственных растений, распространенных на территории европейского Севера России: смолевки обыкновенной *Silene vulgaris* (M.) G., смолевки татарской *Silene tatarica* L. (сем. гвоздичные *Caryophyllaceae*), ряски малой *Lemna minor* L. (сем. рясковые *Lemnaceae*) и пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. (сем. сложноцветные *Compositae*). Клеточные культуры содержат пектиновые вещества с различным строением углеводной цепи, проявляющие физиологическую активность.

Цель работы – исследование состава и строения пектиновых веществ клеточных культур растений и выявление роли гликаназ в модификации их строения при действии абиотических и биотических факторов.

Задачи исследования:

1. Определить качественный и количественный состав пектиновых веществ каллусных культур в сравнении с нативными растениями.

2. Дать сравнительную химическую характеристику пектиновых веществ суспензионной культуры и генетически трансформированной культуры корней (*hairy roots*) смолевки обыкновенной.
3. Установить влияние экзогенных гликаназ на активность ферментов клеточных культур и модификацию продуцируемых ими пектинов и арабиногалактанов с различным строением углеводной цепи.
4. Изучить влияние трофических и гормональных факторов на строение пектинов и арабиногалактанов каллусных культур.
5. Выявить модификацию строения пектиновых веществ и активность гликаназ в каллусных культурах под действием ультрафиолетового облучения.
6. Определить характер действия фитопатогенных грибов на полисахаридный состав и активность гликаназ каллусных культур.
7. Установить роль агробактериальных генов *rol* в регуляции биосинтеза растительных полисахаридов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Культуры клеток разных видов растений синтезируют пектиновые вещества: пектиновые полисахариды и арабиногалактаны. Дедифференцированные клетки продуцируют пектины как близкие, так и отличные от пектинов нативных растений.
2. Качественный и количественный состав пектиновых веществ и биосинтетическая активность линий различаются у каллусных культур разных видов растений, а также у каллусных, суспензионных культур и культуры корней одного вида растения.
3. Трофические и гормональные факторы культивирования влияют на молекулярно-массовое распределение полисахаридов клеточных стенок, что позволяет регулировать биосинтез полисахаридов в культурах клеток.
4. УФ-облучение вызывает увеличение активности гликаназ и эстераз, метилдэтерификацию пектина и изменение строения боковых углеводных цепей пектиновых веществ клеточных стенок.
5. Экзогенные ферменты: полигалактуроназа и β -галактозидаза, - приводят к модификации пектиновых веществ клеточных стенок, которая определяется особенностями их структуры.
6. Трансформация агробактериальными генами *rol* регулирует биосинтетическую активность культивируемых клеток растений, изменяет моносахаридный состав полисахаридов и модулирует активность гликаназ в клетках.
7. Направленная модуляция активности ферментов клеточной стенки с помощью биотехнологических подходов открывает возможность получения полисахаридов с заданной структурой и свойствами.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение состава, строения, содержания и трансформации пектиновых веществ и изменения активности гликаназ и эстераз клеточной стенки в процессе роста растительных клеток под действием абиотических и биотических факторов. Выявлена регуляция содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле, молекулярной массы пектина, степени метилдэтерификации остатков галактуроновой кислоты пектиновой макромолекулы, содержания остатков галактозы и арабинозы в боковых углеводных цепях RG-I и в макромолекуле AG при изменении состава культуральной

среды, действии фитопатогенных грибов, УФ-облучении и трансформации агро-бактериальными генами *rol*.

Впервые получены каллусные культуры смолевки татарской, ряски малой, пижмы обыкновенной и суспензионной культуры смолевки обыкновенной, высокопродуктивные по биомассе и продуцируемым полисахаридам. Создана коллекция каллусных культур этих видов растений и проведена их сравнительная физиолого-биохимическая характеристика. Установлено, что в каллусных и суспензионных культурах, наряду с пектином, характерным для нативных растений, синтезируются кислые арабиногалактаны, которые секретируются в культуральную среду. Дедифференцированные клетки разных видов и классов растений могут продуцировать пектины как близкие, так и отличные от пектинов нативных растений. Выявлены различия в строении пектиновых веществ культур клеток и нативных растений. С помощью каллусных культур показано, что водные растения могут продуцировать пектины, отличающиеся большим количеством, и вероятно, большей разветвленностью боковых цепей макромолекулы RG-I, чем пектины наземных растений.

Обнаружена активация пектинэстеразы с последующей метилдеэтерификацией пектина клеточных стенок под действием УФ-облучения. Выявлены однотипные изменения в клеточных стенках растительных клеток при инфицировании различными фитопатогенными грибами, которые включают снижение молекулярной массы пектина и содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле. Продемонстрировано, что биосинтез растительных полисахаридов зависит от уровня экспрессии агробактериальных генов *rol*. На основании полученных результатов высказано предположение, что механизм действия генов связан как с регуляцией активности гликаназ и эстераз, так и с регуляторным эффектом генов на эндогенные гормоны.

На основании полученных данных сформулирована концепция: реализация механизма реагирования растительных клеток на абиотические и биотические факторы осуществляется путем увеличения или снижения активности гликаназ и эстераз клетки, которые оказывают влияние на постсинтетическую модификацию пектиновых веществ клеточной стенки, в частности, содержание 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле, молекулярную массу пектина, степень метилэтерификации остатков галактуроновой кислоты пектиновой макромолекулы, содержание остатков галактозы и арабинозы в боковых углеводных цепях пектина и в макромолекуле арабиногалактана.

Научно-практическая значимость. Полученные новые данные о влиянии абиотических и биотических факторов на строение пектиновых веществ и активность гидролаз растительных клеток вносят вклад в понимание механизмов функционирования клеточной стенки, в частности, устойчивости к неблагоприятным воздействиям среды, помогают глубже понять принципы взаимодействия живых систем с внешней средой. Результаты исследований имеют значение для понимания и дальнейшего изучения механизмов регуляции физиолого-биохимических процессов в растении и его адаптации к постоянно меняющимся внешним факторам. Полученные результаты исследований вносят вклад в развитие представления о клеточной стенке как о динамичной структуре. Установленный полисахаридный состав культур клеток расширяет представление о строении полисахаридов клеточных стенок наземных и водных растений.

Оптимизированы и запатентованы питательные среды для получения и культивирования каллусных культур смолевки обыкновенной и ряски малой. Разработан и запатентован способ получения пектиновых полисахаридов из биомассы культивируемых тканей растений. С помощью каллусных культур получены пектины, обладающие иммуностимулирующими, противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. Созданная коллекция каллусных культур может служить перспективным материалом для получения линий-продуцентов ценных соединений для различных областей промышленности и сельского хозяйства.

Впервые предложены способы направленной модуляции активности ферментов клеточной стенки, в частности, активации гликаназ и эстераз (α -L-арабинофуранозидазы, β -галактозидазы, полигалактуроназы и пектинэстеразы). Они включают в себя добавление пектиназы и β -галактозидазы в культуральную среду; культивирование каллусных клеток с фитопатогенными грибами и на среде с компонентами клеточных стенок микромицетов; облучение растительных клеток ультрафиолетом; трансформацию агробактериальными генами *rolA*, *rolB* и *rolC*. На основании этих способов предложена стратегия получения из каллусных культур пектинов и арабиногалактанов с заданным строением.

Регуляция процесса продуцирования полисахаридов в культурах клеток растений и селекция высокопродуктивных линий открывают перспективу целенаправленного получения полисахаридов, имеющих ценные технические свойства и обладающих физиологической активностью: создания на основе полисахаридов с высоким содержанием галактуронана новых функциональных продуктов питания, снижающих риск возникновения воспалительных заболеваний; получения на основе пектинов с развитой разветвленной областью адъювантов для пероральной иммунизации людей и животных; получение с помощью культуры клеток пектинов, обладающих высокой антиоксидантной активностью, которые могут найти практическое применение в медицине и косметологии.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены автором в виде устных и стендовых докладов на Международном симпозиуме по гликобиологии (Брауншвайг, Германия, 1998); Менделеевском съезде по общей и прикладной химии «Химия живого» (Москва, 1998, 2007); III Всероссийском совещании «Лесохимия и органический синтез» (Сыктывкар, 1998); Международном конгрессе по биотехнологии (Берлин, Германия, 2000); Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2000, 2006, 2011; Казань, 2002; Саратов, 2004; Уфа, 2008); Третьей Международной выставке-ярмарке «Инновации-2000. Новые материалы и химические продукты» (Москва, 2000); 11-м Европейском симпозиуме по углеводам (Лиссабон, Португалия, 2001); Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создания функциональных продуктов» (Москва, 2001, 2003); 12-м Европейском симпозиуме по углеводам (Гренобль, Франция, 2003); 7-й Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2003); Международной научной конференции «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений» (Алматы, 2003, 2007); Международном междисциплинарном семинаре «Прогресс в биотехнологии и нейробиологии – интегративная медицина» (Хургада, 2004); съезде Общества биотехнологов России (Москва, 2004; 2005; 2008; Пущино, 2006); Международной научной конференции по

биотехнологии (Гаага, Нидерланды, 2006); Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007); IX Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008); Европейском конгрессе «Eurobiotech 2008» (Краков, Польша, 2008); V Межрегиональной конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 90 научных работ, в том числе монография, пять патентов Российской Федерации, 33 статьи (в том числе 6 статей в зарубежных и 14 статей в Российских рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение результатов), заключения, выводов и списка литературы, включающего 302 источника, из них 271 зарубежный. Работа изложена на 283 страницах машинописного текста, содержит 63 таблицы и 11 рисунков.

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии Коми НЦ УрО РАН в рамках плановых тем НИР «Структурно-химические характеристики, биотехнология и физиологическая активность углеводсодержащих соединений природных объектов европейского Севера России. Биотехнология карбогидраз – ферментов углеводного обмена» (ГР № 01.9.60 001209), «Физиологическая активность полисахаридов в зависимости от структуры» (ГР № 01.200 107401), «Выделение, структурная характеристика и физиологическая активность пектин-белковых комплексов» (№ГР 01 200 950823).

Сокращения и условные обозначения. 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, БАП – 6-бензиламинопурин, УФ – ультрафиолет, АГ – внутриклеточный арабиногалактан из каллуса, АГ1 – внеклеточный арабиногалактан из агаризованной среды, АГС – внутриклеточный арабиногалактан из суспензионной культуры, АГС1 – внеклеточный арабиногалактан из суспензионной культуры, ЛМС – лемнан, пектин из каллуса ряски малой, SVC – силенан, пектин из каллуса смолевки обыкновенной, SVS – силенан, пектин из суспензионной культуры клеток смолевки обыкновенной, STC – силенан, пектин из каллуса смолевки татарской, TVC – танацетан, пектин из каллуса пижмы обыкновенной, TFA – трифторуксусная кислота, Мп – среднечисловая молекулярная масса, Mw – средневесовая молекулярная масса, RGI – рамногалактуронан I.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись каллусные культуры смолевки обыкновенной *Silene vulgaris* (M.) G., смолевки татарской *Silene tatarica* L. (сем. гвоздичные *Caryophyllaceae*), ряски малой *Lemna minor* L. (сем. рясковые *Lemnaceae*), пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. (сем. сложноцветные *Compositae*), а также суспензионная культура смолевки обыкновенной и генетически трансформированная культура корней (*hairy roots*) смолевки обыкновенной. Каллусные культуры получали из растений, собранных в естественном местообит-

тании в окрестностях г. Сыктывкара (Республика Коми), и из стерильных растений. Каллусные и суспензионные культуры получены автором, как описано ниже. Культура корней получена И.Н. Кузовкиной в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева (г. Москва). В качестве объектов исследования также были использованы трансгенные и нетрансгенные каллусные культуры марены сердцелистной *Rubia cordifolia* L. (сем. мареновые *Rubiaceae*), женьшеня настоящего *Panax ginseng* С.А. Meyer. (сем. аралиевые *Araliaceae*), родиолы розовой *Rhodiola rosea* L. (сем. толстянковые *Crassulaceae*), винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. (сем. виноградовые *Vitaceae*) и смолевки обыкновенной (сем. гвоздичные *Caryophyllaceae*). Трансгенные культуры марены, родиолы и смолевки предоставил Ю.Н. Шкрыль (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток), а культуры женьшеня и винограда предоставлены сотрудником того же Института К.В. Киселевым.

Получение каллусных культур. Каллусную культуру смолевки татарской и пижмы обыкновенной получали из прикорневых почек нативного растения. Для получения каллусной культуры ряски малой в качестве эксплантов были использованы нативные растения и растения, выращенные *in vitro*. Среда для получения и выращивания каллусов готовили на основе макро- и микроэлементов среды Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962) с добавлением витаминов по Стаба, сахарозы (15 г/л) и глюкозы (15 г/л) или сахарозы (30 г/л) и различных комбинаций фитогормонов. Каллусы выращивали в чашках Петри в термостате при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$ и субкультивировали с интервалом 21 сут (смолевка обыкновенная и смолевка татарская), 28 сут (пижма обыкновенная и ряска малая) и 35 сут (ряска малая). Рост тканей оценивали по приросту сырой и сухой массы за период субкультивирования и выражали индексом роста: $I = (m_i - m_0)/m_0$, где m_0 и m_i (г) исходная и конечная масса каллуса. Удельную скорость роста по сухой массе (μ , сут⁻¹) подсчитывали согласно формуле (Загребельный, 2000): $\mu = (m_i - m_0)/(m_0 t)$, где m_0 – исходная масса каллуса (г), m_i – конечная масса каллуса (г), t – время культивирования (сут). Время удвоения сухой биомассы (T , сут) определяли по формуле: $T = \ln 2/\mu$.

Получение суспензионной культуры. Для получения суспензионной культуры каллус смолевки обыкновенной (2 г) культивировали в 50 мл неагаризованной среды Мурасиге и Скуга с добавлением 2,4-Д (1.0 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл. Суспензионные культуры субкультивировали с интервалом в 10 сут в темноте на качалке (110 об/мин) при $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Изучение влияния различных факторов на физиолого-биохимические характеристики каллусных культур. Каллус смолевки обыкновенной культивировали на среде с пектиназой (10^{-5} -5 мг/мл) (ферментный препарат пектофоедин, активность 2.2 ед/мг, Приволжский биохимический завод, Россия) и на среде с добавлением β -галактозидазы (ЕС 3.2.1.23, активность 11.8 ед/мг, «Sigma», США) в концентрации 10^{-5} -5 мг/мл. Каллус ряски малой культивировали на среде с пектиназой (10^{-3} -1 мг/мл) и β -галактозидазой (10^{-3} -1 мг/мл). Контролем служила среда без ферментов. Стерильные ферменты добавляли после автоклавирования среды.

Каллусы смолевки обыкновенной облучали УФ-В (280-315 нм) интенсивностью 0.63-2.18 Вт/м² в течение 1 ч, а также 0.2-13.0 Вт/м² в течение 3 ч. Облучение проводили с помощью лампы УГД-2 (Россия) на 15-е сут культивирования каллу-

са, анализ – на 21-е сут. Кроме того, каллусы облучали УФ-С (254 нм) интенсивностью 70 Вт/м^2 в течение 10-60 мин с помощью лампы VL-206G («Vilber Lourmat», Франция). Обработку каллуса УФ-С проводили на экспоненциальной фазе роста (12-е сут), а анализ полисахаридов – через 24 ч (13-е сут), на стационарной фазе роста клеток (21-е сут) и через семь пассажей после облучения.

Для определения действия фитопатогенных грибов *in vitro* на полисахаридный состав и активность гликаназ каллуса смолевки обыкновенной каллус сокультивировали с патогенами: *Penicillium dierckxii* F-152 (8.6×10^5 спор), *Trichoderma harzianum* X₀ 2-2 (3.8×10^7 спор), *Fusarium* sp. (9.7×10^5 спор) и *Aspergillus niger* F-1119 (6.9×10^5 спор). Инокуляцию спорами проводили на 18-е сут и сокультивировали в течение 3-х сут. Контролем служили каллус и мицелий, культивированные отдельно. Клетки выращивали при 26°C в термостате. В качестве элиситоров использовали компоненты клеточных стенок микромицетов *A.niger* и *Microbotryum silenes* (Liro) G. Deml & Oberw. F-2974, полученные путем экстракции мицелия водой. Концентрация элиситора соответствует количеству сахаров, определенных по реакции с фенолом в присутствии конц. серной кислоты (Dubois et al., 1956) и калибровочному графику для глюкозы.

Каллусные культуры были трансформированы генами *rolA*, *rolB* и *rolC*. Трансгенные клеточные культуры были получены в БПИ ДВО РАН методом агробактериальной трансформации. Для трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущий бинарную векторную систему, состоящую из двух плазмид: pMP90RK (*vir*-хелперная плазида) и pPCV002 – плазида, содержащая в составе Т-ДНК один из генов *rol* (*rolB* или *rolC*) под контролем промотора 35S CaMV (промотор гена 35S рНК вируса мозаики цветной капусты – *Cauliflower mosaic virus*) и маркерный ген *nptII*, кодирующий неомифосфотрансферазу.

Выделение полисахаридов из каллусных и суспензионных культур. Перед выделением полисахаридов биомассу разрушали путем однократного замораживания-оттаивания. Сырье исчерпывающе экстрагировали в аппарате Сокслета органическими растворителями (метанолом и хлороформом) для удаления низкомолекулярных примесей. Полученный остаток биомассы последовательно экстрагировали водой (50°C), раствором соляной кислоты (рН 4; 50°C) и 0.7%-ным водным раствором оксалата аммония (68°C). Экстракты концентрировали, центрифугировали, полисахарид осаждали 2-кратным объемом 96%-ного этанола, затем растворяли, диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридные фракции внутриклеточного арабиногалактана и пектина.

Экстрацеллюлярные полисахариды выделяли из культуральной среды. Среду центрифугировали, концентрировали, полисахарид осаждали 2-кратным объемом 96%-ного этанола, затем растворяли, диализовали и лиофилизовали. В результате получили фракции внеклеточного арабиногалактана.

Содержание полисахаридных фракций представляли, как процентный выход от сухой биомассы, предварительно обработанной метанолом и хлороформом, и как продуктивность каллуса по полисахариду в г/л. Анализировали пробы, состоящие из 20-25 каллусов. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Общие аналитические методы. В полисахаридных фракциях определяли содержание гликуроновых кислот по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии конц. серной кислоты (Usov et al., 1995), содержание белка – по методу Лоури

(Lowry et al., 1951). Общее содержание углеводов устанавливали по реакции с фенолом в присутствии серной кислоты (Dubois et al., 1956). Средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу полисахаридов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Knutsen et al., 1995).

Полный кислотный гидролиз полисахаридов. Полисахаридные фракции (по 2.0-2.5 мг) гидролизовали 2 М TFA (0.5 мл) при 100°C в течение 3-4 ч. В качестве внутреннего стандарта использовали *мио*-инозит (0.5 мг/мл). Моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов (York et al., 1985).

Ферментативный гидролиз пектинов проводили с помощью пектиназы (1,4- α -D-галактопиранозилураназа, ЕС 3.2.1.15, Sigma, 753 ед/г, оптимум pH 4.0 при 25°C) с преобладающей эндоактивностью и получили смесь фрагментов, которую разделяли на ультрафильтрационных мембранах. В результате получили фракции с M_w более 300 кДа, 100-300 кДа, 50-100 кДа и 10-50 кДа.

Получение фрагментов галактуронанов. Фракции пектинов (300 мг) гидролизовали 2 М TFA (60 мл) при 100°C в течение 5 ч. Полученный осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом, затем растворяли в воде с добавлением 1М аммиака до pH 5.0 и лиофилизовали.

Молекулярно-массовое распределение полисахаридов. Полисахариды растворяли в дист. воде и последовательно разделяли по молекулярной массе в ультрафильтрационной ячейке («Millipore», США) с помощью ультрафильтрационных мембран (полисульфон, «Владисарт», Россия) с различными размерами пор (300, 100, 50 и 10 кДа). Фракции концентрировали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридные фракции с M_w более 300 кДа, 100-300 кДа и 50-100 кДа. С помощью ВЭЖХ проведено подтверждение M_w указанных фракций.

Анализ активности карбогидраз. Сырую биомассу гомогенизировали в 0.05 М натрий-ацетатном буфере (pH 5.0, соотношение биомасса:буфер 1:10), центрифугировали. Затем супернатант диализовали против 0.05 М натрий-ацетатного буфера (pH 5.0) при 4°C. В супернатанте определяли активность внутриклеточных ферментов. Агаризованную культуральную среду центрифугировали, супернатант диализовали против 0.05 М натрий-ацетатного буфера. В супернатанте определяли активность внеклеточных ферментов.

Активность полигалактуроноазы определяли по накоплению редуцирующих сахаров после 10 мин инкубации раствора фермента при 50°C с 1%-ной полигалактуроновой кислотой (ICN, США) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере (pH 4.6). Образовавшиеся восстанавливающие сахара определяли методом Нельсона-Сомоджи. Калибровочный график строили по D-галактуроновой кислоте. За единицу активности пектиназы принимали такое количество фермента, которое освобождает при данных условиях из полигалактуроновой кислоты 1 мкмоль D-галактуроновой кислоты за 1 мин.

Активность α -L-арабинофуранозидазы и β -галактозидазы определяли спектрофотометрическим способом при 400 нм с использованием 4-нитрофенил- α -L-арабинофуранозида и 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозида («Sigma») как субстратов соответственно. Калибровочный график строили по *p*-нитрофенолу. За единицу активности α -L-арабинофуранозидазы и β -галактозидазы принимали такое количество фермента, которое расщепляет 1 мкмоль субстрата за 1 мин при pH 4.2 и 30°C (Полыгалина и др, 2003).

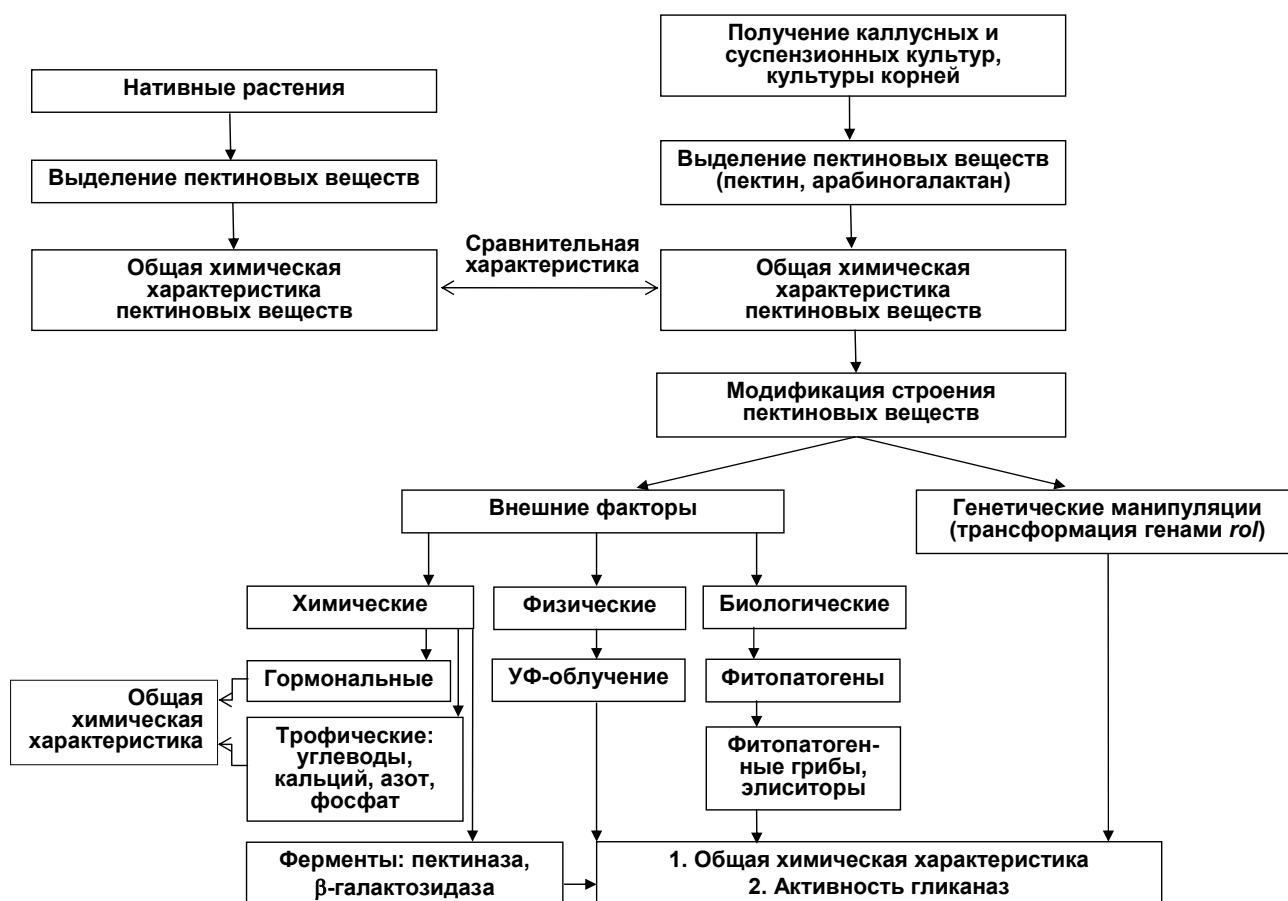
Активность пектинэстеразы устанавливали титрометрическим определением освободившихся карбоксильных групп в результате гидролиза яблочного пектина («Sigma»). За единицу активности пектинэстеразы принимали такое количество фермента, которое обуславливает гидролиз 1 мк-экв сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин при 30°C (Грачева и др., 1982).

Активность 1,3-β-глюканазы (ЕС 3.2.1.39) определяли по накоплению редуцирующих сахаров после инкубации раствора фермента с 1,3-β-глюканом (ламинарин, «Sigma»). Реакционную смесь, состоящую из ферментного экстракта и ламинарина (0.1%) инкубировали 40 мин при 37°C (Lozovaya et al., 1998). За единицу активности 1,3-β-глюканазы принимали такое количество фермента, которое освобождает при данных условиях 1 мкмоль редуцирующих сахаров за 1 мин.

Активность ферментов выражали как отношение единицы активности фермента к 1 мг белка (ед/мг). Эксперименты проводили в 4-х повторностях.

Статистический анализ. При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Достоверность оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Общая схема методологического подхода, использованного в работе:



РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительная химическая характеристика пектиновых веществ каллусных культур и нативных растений

Индуцировано и охарактеризовано 14 линий каллусных культур ряски малой, линии смолевки татарской и пижмы обыкновенной, имеющие разные ростовые и морфологические характеристики (табл. 1). Прирост сухой биомассы раз-

личных линий ряски составляет 8.3-11.9 г/л, индекс роста по сухой биомассе – 2.9-5.5, удельная скорость роста – 0.08-0.16 сут⁻¹, время удвоения биомассы – 4.5-7.1 сут, продуктивность по сухой биомассе – 0.19-0.28 г/л/сут. Подобраны среды для поддержания устойчивого роста каллуса ряски малой при длительном культивировании – 2,4-Д + БАП, мг/л: 0.5+1.0; 1.0+0.5; 2.0+1.0. Оптимальным сочетанием фитогормонов для поддержания роста каллуса смолевки татарской и пижмы обыкновенной являются комбинации 2,4-Д, 1.0 мг/л + БАП, 0.5 мг/л и 2,4-Д, 1.5 мг/л + БАП, 0.5 мг/л соответственно.

Таблица 1. Характеристика линий из коллекции каллусных культур

Линия	Прирост биомассы, г/л		Индекс роста		μ, сут ⁻¹	Р, г/л/сут	Т, сут
	сырой	сухой	по сырой массе	по сухой массе			
Ряска малая <i>Lemna minor</i>							
Lm1*	177.6±0.6	8.7±0.3	4.4±0.6	4.9±0.7	0.14±0.01	0.21±0.01	4.9±0.2
Смолевка татарская <i>Silene tatarica</i>							
ST	522.4±29.2	14.9±0.5	15.7±4.1	17.1±1.8	0.82±0.03	0.67±0.02	0.9±0.03
Пижма обыкновенная <i>Tanacetum vulgare</i>							
TV	386.8±31.8	15.6±0.1	10.7±2.8	8.4±1.9	0.30±0.10	0.56±0.003	2.3±0.4

Примечания: μ – удельная скорость роста по сухой биомассе; Р – продуктивность по сухой биомассе; Т – время удвоения сухой биомассы; * характеристики других линий ряски здесь не приводятся.

Таким образом, создана коллекция каллусных культур, среди которых лучшими ростовыми характеристиками обладает каллус смолевки татарской.

1.1. Смолевка обыкновенная *S. vulgaris*

Общая химическая характеристика. Нами были выделены из 16 каллусных линий *S. vulgaris* экстракцией водой и раствором оксалата аммония полисахаридные фракции: арабиногалактан AG и силенан SVC (Гюнтер и Оводов, 2007). В настоящей работе с помощью современных методов химии углеводов дана общая химическая характеристика силенана и внутриклеточного AG, а также внеклеточного AG1. Показано, что расщепление силенана SVC из каллуса с помощью пектиназы (1,4- α -D-галактопиранозилураназа) свидетельствует о том, что 1,4- α -D-галактуронан является главной углеводной цепью силенана. В результате жесткого кислотного гидролиза SVC получен галактуронан с выходом 54%. Содержание во фракциях, полученных в результате ферментативного гидролиза пектиназой, остатков арабинозы и галактозы, обычно входящих в состав боковых цепей пектинов, а также присутствие остатков рамнозы свидетельствует о том, что образовавшиеся под действием пектиназы фрагменты углеводной цепи SVC содержат разветвленные участки, представленные RG-I (табл. 2). Боковые цепи силенана скорее всего представляют собой арабинаны, галактаны и/или арабиногалактаны. С помощью ультрафильтрации установлено, что SVC состоит в основном из слабо разветвленных пектиновых фрагментов с Mw более 300 кДа (табл. 2).

Таким образом, макромолекула силенана, полученного из каллуса, состоит из линейных и разветвленных областей. Фрагмент линейной цепи галактуронана составляет более половины всей углеводной цепи силенана. Разветвленная область макромолекулы представлена RG-I.

Таблица 2. Характеристика полисахаридных фракций силенана из каллуса, полученных в результате ультрафильтрации^а и ферментативного гидролиза^б

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма			
SVC	10.6*	1.7	1.4	0.9	0.7	0.5	0.7	5.9	63.5	11.6	416
SVC-I ^а	77.1**	1.6	1.7	1.2	0.4	0.3	0.5	5.7	81.9	14.1	>300
SVC-II ^а	0.8**	10.8	5.1	2.7	2.3	1.1	1.1	23.1	55.9	1.7	100-300
SVC-III ^а	0.4**	19.7	11.7	5.5	3.0	5.0	1.9	46.8	29.6	0	50-100
SVC-P ^б	51.7**	3.0	1.8	0.5	0.8	0.4	0.7	7.2	55.3	9.2	
SVC-PI ^б	71.4***	2.2	1.6	0.5	0.5	0.2	0.6	5.6	54.0	12.8	>300
SVC-PII ^б	24.3***	2.3	2.0	0.9	0.5	0.2	0.2	6.1	78.1	0	100-300
SVC-PIII ^б	1.1***	9.6	3.0	1.6	5.0	4.1	2.8	26.1	50.3	0	50-100
SVC-PIV ^б	1.3***	8.4	2.6	2.8	5.9	3.0	3.7	26.4	11.6	0	10-50

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции SVC. *** Выход от фракции SVC-P, полученной в результате ферментативного гидролиза силенана SVC. I – фракции с Mw >300 кДа; II – фракции с Mw 100–300 кДа; III – фракции с Mw 50–100 кД; IV – фракции с Mw 10–50 кДа.

Ранее нами было показано, что полисахариды нативного растения, выделенные экстракцией водой и раствором оксалата аммония из листьев, стеблей, цветков и корней смолевки обыкновенной, являются пектиновыми полисахаридами (Гюнтер и Оводов, 2007). По моносахаридному составу силенан SV из растения (Оводова и др., 2000) близок силенану SVC из каллуса и имеет высокое содержание остатков D-галактуроновой кислоты и участков линейного α -1,4-D-галактуронана (Гюнтер и др., 2011). В настоящей работе показано, что SVC отличается от SV более высокой Mw. Исходя из результатов сравнительного анализа строения фрагментов, полученных в результате ферментативного гидролиза пектиназой, можно предположить, что силенаны SVC и SV, содержат близкие по строению участки разветвленной области, представленной RG-I.

В соответствии с ранее полученными данными (Günter and Ovodov, 2002; Гюнтер и Оводов, 2007) показано, что доминирующими нейтральными составляющими внутриклеточного AG каллусных линий смолевки обыкновенной являются остатки арабинозы (6-13%) и галактозы (25-41%) в соотношении 1:(2.3-6.5), содержание галактуроновой кислоты и белка составляет 8-12% и 9-39% соответственно.

Нами выявлено, что AG1, выделенный из культуральной среды, имеет близкий моносахаридный состав с AG из каллусных клеток. При этом сохраняется соотношение арабинозы и галактозы 1:4.7 и содержание остатков галактуроновой кислоты, придающих кислый характер арабиногалактанам (табл. 3). AG и AG1 являются гетерогенными по молекулярным массам, в составе которых доминируют фрагменты с Mw >300 кДа. AG1 обладает меньшей Mw, чем AG, что обусловлено присутствием в AG1 большего количества фрагментов с Mw 100-300 кДа, чем в AG (табл. 3). В составе фракций присутствует незначительная примесь ксилоглокана.

Содержание полисахаридов. Содержание AG1 в культуральной среде составляет 0.15 ± 0.02 г/л среды, что в 2.8 раза ниже, чем содержание AG в каллусных клетках. Ранее было показано, что выход силенана в различных линиях варьирует

от 1 до 11 % от сухой массы, выход AG составляет 4-8%, продуцирование силенана и AG составляет 0.06-0.83 и 0.18-0.44 г/л среды соответственно (Гюнтер и Оводов, 2007). Каллусы по содержанию полисахаридов сравнимы с нативными растениями (выход 1-3%) или заметно превосходят их.

Таблица 3. Характеристика фракций арабиногалактанов каллуса смолевки обыкновенной, полученных в результате ультрафильтрации

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма			
AG	5.4*	37.8	7.9	1.9	0.7	4.7	0.9	53.9	5.6	9.1	197
AG-I	58.7**	55.2	7.9	2.1	0	2.6	0	67.8	5.6	6.5	>300
AG-II	14.6**	46.8	10.7	2.8	3.3	6.5	1.3	71.4	5.7	6.5	100-300
AG-III	6.2**	36.0	8.5	2.5	16.3	14.3	0.5	78.1	4.2	6.8	50-100
AG-IV	7.2**	20.7	4.8	1.3	13.1	9.4	2.0	51.3	1.6	5.3	<50
AG1		45.8	9.8	2.1	5.5	7.7	1.0	71.9	11.4	9.5	125
AG1-I	48.7***	32.8	6.2	1.0	0.4	3.1	0.2	43.7	8.7	4.9	>300
AG1-II	29.9***	50.7	14.3	1.6	1.1	5.4	0.8	73.9	7.4	6.9	100-300
AG1-III	5.2***	40.2	8.0	1.2	5.3	10.4	1.1	66.2	6.5	4.0	50-100
AG1-IV	7.6***	10.6	2.4	0.2	9.0	4.1	0.7	27.0	2.2	9.4	<50

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции AG (внутриклеточный арабиногалактан). *** Выход от фракции AG1 (внеклеточный арабиногалактан).

I – фракции с Mw >300 кДа; II – фракции с Mw 100–300 кДа; III – фракции с Mw 50–100 кД; IV – фракции с Mw 10–50 кДа.

Таким образом, силенан из каллуса *S. vulgaris* имеет близкое с силенаном из нативного растения строение углеводной цепи: макромолекула силенана, состоит из линейных и разветвленных областей и характеризуется высоким содержанием участков линейного α -1,4-D-галактуронана; разветвленная область макромолекулы представлена RG-I.

1.2. Смолевка татарская *S. tatarica*

Общая химическая характеристика. Экстракцией водой и раствором оксалата аммония из каллуса смолевки татарской выделены две полисахаридные фракции: арабиногалактан AG и силенан STC. Из культуральной среды получен внеклеточный арабиногалактан AG1. Доминирующими составляющими силенана STC являются остатки D-галактуроносовой кислоты (56-69 %), галактозы (4-7 %), арабинозы (2.8-6.3 %) и рамнозы (1.5-3.1 %) (табл. 4).

Присутствие в большом количестве остатков галактуроносовой кислоты, а также расщепление полисахарида с помощью пектиназы указывает на то, что 1,4- α -D-галактуронан является главной углеводной цепью силенана STC и подтверждает его принадлежность к классу пектинов. В результате жесткого кислотного гидролиза STC получен галактуронан с выходом 34%, что ниже выхода галактуронана в SVC смолевки обыкновенной. В составе всех фрагментов STC, образовавшихся под действием пектиназы, доминируют остатки галактуроносовой кислоты, галактозы и арабинозы (табл. 4). Полученные данные указывают на то, что фрагменты углеводной цепи STC, как и SVC, содержат разветвленные участки, представленные RG-I. Боковые цепи STC скорее всего представляют собой арабианы, галактаны и/или арабиногалактаны. STC, как и SVC, является гетерогенным по молекулярным массам: в его состав входят в основном слабо разветвленные

полисахаридные компоненты с Mw более 300 кДа (табл. 4). При этом содержание более разветвленных фрагментов с Mw 100-300 и 50-100 кДа выше в макромолекуле STC, чем в SVC.

Таблица 4. Характеристика полисахаридов каллусной культуры *S. tatarica*, полученных в результате ультрафильтрации^а и ферментативного гидролиза^б

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма			
STC	3.5*	6.5	6.0	3.0	2.1	1.1	1.1	19.9	64.0	6.1	246
STC-I ^а	64.6**	5.3	4.0	2.1	1.3	0.8	0.9	14.4	65.5	2.4	>300
STC-II ^а	12.7**	7.8	5.5	2.7	7.5	2.6	0.2	26.3	44.5	0	100-300
STC-III ^а	3.4**	8.8	4.8	2.1	10.3	10.3	2.8	39.1	33.4	0	50-100
STC-P ^б	42.2**	4.7	4.7	1.0	1.2	0.7	0.7	13.0	79.8	8.3	
STC-PI ^б	27.6***	4.0	5.4	0.5	0.4	0.3	0.5	11.1	55.1	5.8	>300
STC-PII ^б	31.3***	1.8	2.8	0.5	0.1	0.1	0.1	5.4	78.2	0.9	100-300
STC-PIII ^б	18.0***	1.7	1.2	0.3	0.8	0.3	0.7	5.0	70.7	0	50-100

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции STC. *** Выход от фракции STC-P, полученной в результате ферментативного гидролиза силенана STC.

I – фракции с Mw >300 кДа; II – фракции с Mw 100–300 кДа; III – фракции с Mw 50–100 кД.

Показано, что полисахариды, выделенные из листьев, стеблей, цветков и корней нативного растения смолевки татарской с помощью экстракции раствором оксалата аммония, обладают близким моносахаридным составом, характерным для пектинов. STC отличается более высокой Mw и более высоким содержанием остатков галактозы и арабинозы, а также более низким содержанием остатков галактурановой кислоты по сравнению с силенаном из нативного растения. Полученные данные свидетельствуют о большем количестве боковых цепей и, вероятно, большей разветвленности силенана из каллуса.

Кислые арабиногалактаны, выделенные из каллусных клеток смолевки татарской (AG) и культуральной среды (AG1), имеют близкий качественный и количественный моносахаридный состав. Соотношение арабиноза/галактоза (1:8.2-9.3) и содержание остатков галактурановой кислоты является близким в обоих полисахаридах (табл. 5). Содержание белка в 3.8 раза выше в AG, чем в AG1. Показано, что AG1 обладает меньшей Mw, чем AG. Фракции AG и AG1 являются гетерогенными по молекулярным массам (Mw 50-300 кДа) и имеют большую Mw, чем таковые смолевки обыкновенной. AG1 представляет собой смесь галактана и арабиногалактана (табл. 5). Кроме того, в составе AG и AG1 присутствует незначительная примесь ксилоглюкана и/или ксилана и глюкана, которые могут выделяться попутно с арабиногалактанами.

Показано, что полисахариды, выделенные с помощью экстракции водой из нативного растения смолевки татарской (листья, стебли, цветков и корней), являются слабокислыми полисахаридами с близким моносахаридным составом, свойственным AG. AG каллуса смолевки татарской отличается от AG нативного растения более высоким содержанием остатков галактозы и низким – остатков арабинозы, а также меньшим количеством белка.

Содержание полисахаридов. Выход пектина от сухой биомассы каллуса смолевки татарской составляет 3-4%, выход внутриклеточного AG – 4-6%. Продукция силенана и AG на литр питательной среды составляет 0.11-0.16 и 0.28-0.44 г/л среды соответственно. Содержание внеклеточного AG1 равняется

0.19-0.22 г/л. Выход пектина в различных органах растения в фазе цветения варьирует от 0.7% до 2.3% от сухой массы, при этом уровень биосинтеза является максимальным в листьях, а минимальным – в стеблях; выход арабиногалактана составляет 0.2-0.3%.

Таблица 5. Характеристика фракций арабиногалактанов каллуса смолевки татарской, полученных в результате ультрафильтрации

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма			
AG	5.0*	37.0	4.0	2.0	3.1	3.6	2.1	51.8	12.3	32.9	276
AG-I	59.3**	41.7	4.2	1.9	2.9	2.2	1.2	54.1	6.4	6.7	>300
AG-II	13.9**	32.4	6.3	1.4	33.8	6.7	5.6	86.2	6.0	6.5	100-300
AG-III	5.1**	21.1	4.4	0.3	27.8	16.8	2.6	73.0	3.2	5.8	50-100
AG-IV	10.5**	12.9	4.7	0.6	29.6	15.3	4.1	67.2	2.5	7.4	<50
AG1		33.6	4.1	0.5	4.2	12.9	2.2	57.4	10.7	8.7	196
AG1-I	54.5***	42.1	2.5	0.3	0.7	4.3	0.3	50.2	12.2	6.7	>300
AG1-II	19.4***	30.7	9.8	2.5	1.0	18.0	0.3	62.3	12.4	5.0	100-300
AG1-III	9.8***	20.0	3.4	0.4	6.0	42.7	1.2	73.7	10.9	4.6	50-100
AG1-IV	13.0***	9.8	4.2	0.5	17.4	20.0	8.9	60.8	5.6	8.7	<50

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции AG (внутриклеточный арабиногалактан). *** Выход от фракции AG1 (внеклеточный арабиногалактан). I – фракции с Mw >300 кДа; II – фракции с Mw 100–300 кДа; III – фракции с Mw 50–100 кД; IV – фракции с Mw 10–50 кДа.

Таким образом, в каллусе и в нативном растении *S. tatarica* осуществляется биосинтез пектина и AG, при этом каллус продуцирует большее количество полисахаридов. Макромолекула силенана из каллуса состоит из линейного галактуронана, который составляет менее половины всей углеводной цепи, и разветвленной области, представляющей собой RG-I. Силенан из каллуса, по сравнению с нативным растением, отличается большим содержанием остатков галактозы и арабинозы в боковых углеводных цепях RG-I.

1.3. Пижма обыкновенная *T. vulgare*

Общая химическая характеристика. Экстракцией водой и раствором оксалата аммония из каллуса пижмы выделены внутриклеточный AG и танацетан TVC соответственно. Из культуральной среды получен внеклеточный AG1. TVC подвергается расщеплению пектиназой, что свидетельствует о том, что 1,4- α -D-галактуронан является главной углеводной цепью танацетана, и служит доказательством принадлежности этого полисахарида к классу пектинов (табл. 6). В результате жесткого кислотного гидролиза TVC получен галактуронан с выходом 63%, что выше выхода галактуронана в SVC и STC. Образовавшиеся под действием пектиназы фрагменты углеводной цепи TVC содержат разветвленные участки RG-I. Остатки арабинозы и галактозы входят в состав боковых цепей TVC, которые представлены арабинанами, галактанами и/или арабиногалактанами. TVC отличается незначительной гетерогенностью по молекулярной массе: в его состав входят в основном слабо разветвленные фрагменты с Mw более 300 кДа и минорное количество более разветвленных компонентов с Mw 100-300 кДа (табл. 6). Для TVC характерна более высокая Mw, чем для SVC и STC.

Показано, что полисахариды, выделенные экстракцией водой из цветков и корней нативного растения, а также раствором оксалата аммония из листьев, стеблей, цветков и корней пижмы обыкновенной, обладают близким моносахаридным составом, характерным для пектинов. Ранее было показано, что танацетан из нативного растения состоит из линейного α -1,4-D-галактуронана и разветвленной области, представленной RG-I (Полле и др., 2001). Нами выявлено, что по моносахаридному составу TVC близок танацетану TV из нативного растения и имеет более высокое процентное содержание линейного α -1,4-D-галактуронана. Можно предположить, что TVC и TV, содержат близкие по строению участки разветвленной области, представленной RG-I.

Таблица 6. Характеристика полисахаридов каллусной культуры *T. vulgare*, полученных в результате ультрафильтрации^a и ферментативного гидролиза^b

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма			
TVC	6.0*	4.4	5.2	1.5	1.4	1.1	0.4	13.9	68.0	8.3	521
TVC-I ^a	82.4**	2.3	4.1	1.0	0.8	0.4	0.2	8.8	77.0	7.6	>300
TVC-II ^a	2.4**	7.9	8.7	2.0	1.6	1.3	0.4	21.9	41.2	37.1	100-300
TVC-III ^a	7.8**	1.2	2.1	0.4	2.2	1.6	1.0	8.5	2.0	6.3	50-100
TVC-P ^b	59.9**	1.5	4.0	0.4	0.4	0.6	0.2	7.1	85.7	4.3	
TVC-PI ^b	48.0***	2.0	3.4	0.4	0.3	0.3	0	6.4	89.1	0	>300
TVC-PII ^b	29.8***	2.2	4.0	0.3	0.5	0.3	0.1	7.4	76.4	0.9	100-300
TVC-PIII ^b	5.8***	2.7	2.5	0.4	0.5	0.8	0.1	7.0	69.0	2.8	50-100

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции TVC. *** Выход от фракции TVC-P, полученной в результате ферментативного гидролиза танацетана TVC.

I – фракции с Mw >300 кДа; II – фракции с Mw 100–300 кДа; III – фракции с Mw 50–100 кД.

AG и AG1 каллусной культуры имеют близкий качественный и количественный моносахаридный состав и соотношение арабиноза/галактоза (1:5.1-6.3), тогда как количество белка в 4.8 раза выше в AG, чем в AG1 (табл. 7).

Таблица 7. Характеристика фракций арабиногалактанов каллуса пижмы, полученных в результате ультрафильтрации

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма			
AG	8.0*	26.0	5.1	0	1.4	1.1	0.4	37.3	3.6	50.5	332
AG-I	64.4**	33.3	3.2	0.2	6.5	2.4	0.7	46.3	5.1	17.5	>300
AG-II	17.0**	41.7	15.7	0.3	6.9	3.0	1.0	68.6	2.3	25.6	100-300
AG-III	3.2**	23.6	9.4	0.6	10.7	8.5	0.8	53.6	3.0	28.0	50-100
AG-IV	5.6**	12.5	8.6	0	12.6	8.7	1.3	43.7	0	8.5	<50
AG1		33.5	5.3	0.1	3.5	5.5	0.7	48.5	9.3	10.5	243
AG1-I	78.7***	41.9	2.7	0	1.3	4.0	0.2	50.1	9.8	11.9	>300
AG1-II	18.9***	39.9	12.8	0.1	1.4	5.4	0.4	60.0	11.4	12.7	100-300
AG1-III	8.3***	28.3	11.0	0.2	15.0	12.8	1.5	68.8	6.5	16.2	50-100

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции AG (внутриклеточный арабиногалактан). *** Выход от фракции AG1 (внеклеточный арабиногалактан). I – фракции с Mw >300 кДа; II – фракции с Mw 100–300 кДа; III – фракции с Mw 50–100 кД; IV – фракции с Mw 10–50 кДа.

AG обладает большей Mw, чем AG1. Фракции AG и AG1 являются гетерогенными по Mw (50-300 кДа) и имеют большую Mw, чем таковые смолевки и ряс-

ки (табл. 7). Установлено, что фракции AG и AG1 представляют собой смесь галактана и арабиногалактана, в которой присутствует незначительная примесь ксилоглюкана. При этом доминирующая по выходу фракция с Mw более 300 кДа представляет собой галактан, фракция с Mw 100-300 кДа – кислый арабиногалактан, а фракции с Mw 50-100 кДа и <50 кДа – смесь арабиногалактана и ксилоглюкана.

Содержание полисахаридов. Выход TVC от сухой биомассы каллуса пижмы составляет 5-7%, выход AG – 7-9%. Продуцирование TVC и AG на литр питательной среды составляет 0.38 и 0.47 г/л среды соответственно. Содержание внеклеточного AG1 равняется 0.07-0.14 г/л, что в 3.6 раза ниже, чем содержание AG в каллусе. Суммарное содержание танацетана в различных органах растения в фазе цветения варьирует от 1.7% до 11.4% от сухой массы, при этом уровень биосинтеза является максимальным в листьях, а минимальным – в стеблях.

Таким образом, танацетаны из каллуса и из нативного растения имеют близкое строение углеводной цепи: макромолекула танацетана состоит из линейного галактуронана, который составляет более половины всей углеводной цепи, и разветвленной области, представляющей собой RG-I. Каллусная культура пижмы обыкновенной, по сравнению с нативным растением, продуцирует равное или большее количество полисахаридов.

1.4. Ряска малая *L. minor*

Общая химическая характеристика. Из 14 каллусных линий ряски выделено по две полисахаридные фракции: экстракцией водой – кислый арабиногалактан AG и раствором оксалата аммония – пектин лемнан LMC. Из культуральной среды получен внеклеточный AG1. В образцах LMC всех линий главными компонентами являются остатки галактуроновой кислоты (33-57 %), галактозы (8.2-15.2 %), арабинозы (7.1-15.5 %) и рамнозы (2.0-3.1 %). Соотношение арабиноза/галактоза составляет 1:(0.8-1.2). Остатки апиозы, глюкозы, ксилозы и маннозы присутствуют в меньшем количестве. Наибольшее содержание остатков апиозы обнаружено в LMC семи каллусных линий и составляет 3.5-4.7 %. Суммарное содержание нейтральных моносахаридных остатков варьирует от 26 до 50%, что связано с различной степенью разветвления и количеством боковых цепей в образцах пектина, полученных из разных клеточных линий.

Расщепление LMC с помощью пектиназы свидетельствует о том, что 1,4- α -D-галактуронан является основной углеводной цепью лемнана, подтверждая принадлежность этого полисахарида к классу пектинов. В результате жесткого кислотного гидролиза LMC получен галактуронан с выходом 27%, что значительно ниже выхода галактуронана в TVC, SVC и STC. Высокое содержание во фракциях LMC-PI–LMC-PIV остатков арабинозы и галактозы свидетельствует о том, что устойчивые к действию пектиназы компоненты углеводной цепи LMC являются разветвленными участками RG-I (табл. 8). Боковые цепи лемнана скорее всего представлены арабинами, галактанами и/или арабиногалактанами. Наличие остатков апиозы в составе LMC может свидетельствовать о присутствии апиогалактуронанового полисахарида в составе разветвленной области.

С помощью ультрафильтрации показано, что лемнан состоит из разветвленных пектиновых компонентов, гетерогенных по молекулярной массе (табл. 8). В

состав ЛМС входят в основном разветвленные фрагменты с Mw более 300 кДа и меньшее количество более разветвленных компонентов с Mw 100-300 и 50-100 кДа (табл. 8). Для ЛМС характерна большая разветвленность макромолекулы и меньшая Mw, чем для TVC, SVC и STC. При фракционировании лемнана на DEAE-целлюлозе показана его незначительная гетерогенность.

Таблица 8. Характеристика полисахаридных фракций ЛМС, полученных в результате ультрафильтрации^а и ферментативного гидролиза^б

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %								GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Api	Сумма			
ЛМС	1.8*	8.5	7.1	2.3	2.3	2.0	0.7	2.8	25.7	56.3	8.3	124
ЛМС-I ^а	68.6**	9.6	11.9	3.1	1.4	2.0	0.4	1.4	29.8	67.0	3.6	>300
ЛМС-II ^а	10.5**	19.8	18.3	2.5	3.4	3.3	0.8	1.3	49.4	35.0	0	100-300
ЛМС-III ^а	3.5**	30.5	23.3	2.6	4.8	10.5	0.6	3.3	75.6	31.3	0	50-100
ЛМС-PI ^б	19.1***	30.8	25.9	9.1	2.3	5.1	0.9	3.5	77.6	31.4	0	>100
ЛМС-PII ^б	3.8***	20.8	18.4	7.7	2.8	6.8	0.8	5.1	62.3	47.9	0	50-100
ЛМС-PIII ^б	5.8***	5.9	6.0	5.0	3.3	4.8	0.7	4.8	30.5	69.5	0	10-50
ЛМС-PIV ^б	13.9***	1.6	0.8	1.1	1.3	0.7	0.3	0	5.7	71.7	0	<10

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции ЛМС. ЛМС-I – фракция с Mw >300 кДа; ЛМС-II – фракция с Mw 100–300 кДа; ЛМС-III – фракция с Mw 50–100 кД. *** Выход от фракции ЛМС-Р, полученной в результате ферментативного гидролиза лемнана ЛМС. ЛМС-PI – фракция с Mw >100 кДа; ЛМС-PII – фракция с Mw 50–100 кДа; ЛМС-PIII – фракция с Mw 10–50 кД; ЛМС-PIV – фракция с Mw <10 кДа.

Показано, что полисахариды, выделенные из нативного растения ряски, обладают моносахаридным составом, характерным для пектинов. Ранее было показано, что лемнан нативного растения имеет в макромолекуле участки 1,4- α -D-галактуронана, апиогалактуронана и гетерогликаногалактуронана (Оводова и др., 2000; Golovchenko et al., 2002).

Содержание остатков галактозы и арабинозы выше в 3 и 6 раз соответственно в макромолекуле лемнана из каллуса ряски, чем из растения. Содержание апиозы в лемнане из растения значительно выше (9-20%) (Golovchenko et al., 2002), чем в лемнане из каллуса (1-5%). Отличия в содержании нейтральных моносахаридных остатков, вероятно, связаны с переходом клеток к дедифференцированному состоянию.

AG и AG1 каллусной культуры отличаются по содержанию моносахаридных остатков. Для AG характерно более низкое соотношение арабиноза/галактоза (1:2.0-3.2) по сравнению с AG1 (1:7), а также увеличенное в 2.6 раза содержание белка (табл. 9). Фракции AG и AG1 ряски являются гетерогенными по Mw (50-300 кДа) и имеют меньшую Mw, чем таковые смолевки и пижмы (табл. 9). Кроме того, в составе AG и AG1 присутствует незначительная примесь ксилана. Фракция AG1 представляет собой смесь галактана и арабиногалактана. При этом в AG1 фракция с Mw более 300 кДа представляет собой галактан, фракции с Mw 100-300 и 50-100 кДа, доминирующие по выходу, и фракция с Mw <50 кДа – смесь кислого арабиногалактана и ксилана (табл. 9). При фракционировании AG на DEAE-целлюлозе получены четыре слабокислые фракции (AG₁–AG₄), которые представляют собой кислые арабиногалактаны с примесью ксилана и/или ксилоглюкана.

Содержание полисахаридов. Процентное содержание лемнана в различных линиях варьирует от 0.9 до 3.3 % от сухой массы, выход AG колеблется от 0.9 до

2.7%. Продуцирование лемнана и AG составляет 0.10-0.31 г/л среды. Содержание внеклеточного AG1 составляет 0.24 ± 0.05 г/л среды, что в 2.2 раза выше, чем содержание AG в каллусных клетках. Выход лемнана в нативном растении равняется 4.6% от сухой массы.

Таблица 9. Характеристика фракций арабиногалактанов каллуса ряски, полученных в результате ультрафильтрации

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %								GalA, %	Белок, %	Mw, кДа
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Api	Сумма			
AG	1.3*	35.4	13.5	0.8	3.3	23.4	0.8	0.4	77.6	4.4	21.2	104
AG-I	11.3**	51.9	15.0	1.1	1.3	18.1	0.7	0.4	88.5	8.7	8.4	>300
AG-II	36.1**	49.7	18.0	0.8	0.9	23.5	0.4	0.3	93.6	7.6	3.7	100-300
AG-III	19.5**	21.9	8.3	0.3	4.1	26.5	0.4	0	61.5	6.4	18.9	50-100
AG-IV	19.9**	7.1	4.2	0.5	3.6	8.1	0.8	0.3	24.6	0.4	21.1	<50
AG1		34.7	5.4	0.5	3.6	36.8	0.7	0	81.7	13.7	8.3	111
AG1-I	15.0***	54.5	1.1	0.1	0.9	5.4	0	0	62.0	13.3	0	>300
AG1-II	27.5***	35.0	6.0	0	0.5	16.9	0	0	58.4	13.2	0.8	100-300
AG1-III	29.4***	13.4	5.3	0.1	0.6	49.6	0	0	69.0	13.9	1.2	50-100
AG1-IV	15.9***	10.7	2.6	0	9.5	28.7	0.4	0	51.9	6.1	5.8	<50

Примечания: * Выход от сухой биомассы каллуса. ** Выход от фракции AG (внутриклеточный арабиногалактан). *** Выход от фракции AG1 (внеклеточный арабиногалактан).

I – фракции с Mw >300 кДа; II – фракции с Mw 100–300 кДа; III – фракции с Mw 50–100 кД; IV – фракции с Mw 10–50 кДа.

Таким образом, дедифференцированные клетки ряски малой продуцируют пектины, отличные от пектинов нативного растения. Макромолекула лемнана состоит из линейного галактуронана, который составляет менее половины всей углеводной цепи, и разветвленной области, представленной RG-I и, возможно, апиогалактуронаном. Лемнан из каллуса, по сравнению с нативным растением, отличается большим содержанием остатков галактозы и арабинозы в боковых углеводных цепях RG-I и меньшим содержанием остатков апиозы. Наряду с лемнаном, каллусные культуры продуцируют внутриклеточный и внеклеточный кислые арабиногалактаны. Каллус, по сравнению с нативным растением, синтезирует несколько меньшее количество лемнана.

Итак, каллусные культуры, наряду с пектином, характерным для нативных растений, синтезируют кислые арабиногалактаны, которые секретируются в культуральную среду. Культуры клеток по содержанию полисахаридов сравнимы с нативными растениями или заметно превосходят их. Дедифференцированные клетки разных видов растений продуцируют пектины, близкие (клетки смолевки обыкновенной и пижмы) или отличные (клетки смолевки татарской и ряски) от пектинов нативных растений. Различия в строении пектинов связаны с переходом клеток к дедифференцированному состоянию.

Пектины каллусных культур, подобно пектинам нативных растений, состоят из линейных и разветвленных областей. Выход 1,4- α -D-галактуронана, как основного компонента главной углеводной цепи, полученного в результате жесткого кислотного гидролиза, варьирует для различных пектинов: TVC > SVC > STC > LMC. Разветвленная область макромолекулы представлена RG-I, который отличается разнообразием структуры для различных пектинов. Выявлено, что для пектинов каллусов смолевки и пижмы характерно низкое содержание остатков галакто-

зы и арабинозы в боковых углеводных цепях в сравнении с пектинами каллуса ряски. Пектины каллусных культур смолевки, ряски и пижмы, отличаются по молекулярной массе: TVC > SVC > STC > LMC.

Внутриклеточные и внеклеточные АГ из каллусных культур смолевки, ряски и пижмы, отличаются по молекулярной массе: пижмы обыкновенной > смолевки татарской > смолевки обыкновенной > ряски малой. АГ каллусных культур отличаются строением боковых цепей: АГ каллусов смолевки татарской и пижмы обыкновенной, по сравнению с каллусами смолевки обыкновенной и ряски малой, отличаются более низким содержанием остатков арабинозы. АГ каллуса смолевки обыкновенной и смолевки татарской отличаются более высоким содержанием остатков галактозы, чем АГ каллуса ряски и пижмы.

2. Сравнительная химическая характеристика пектиновых веществ суспензионной культуры и культуры корней (*hairy roots*) смолевки обыкновенной

Суспензионная культура. Для суспензионной культуры клеток смолевки обыкновенной *S. vulgaris* прирост сырой и сухой биомассы клеток составляет 298 и 6 г/л соответственно, индексы роста по сырой и сухой массе – 31.1 и 26.6 соответственно, удельная скорость роста – 2.7 сут^{-1} , время удвоения биомассы – 0.3 сут, продуктивность по сухой биомассе – 0.15 г/л/сут.

Из клеток суспензионной культуры смолевки экстракцией водой и раствором оксалата аммония выделены полисахаридные фракции: внутриклеточный арабиногалактан AGS и силенан SVS. Из культуральной среды получен внеклеточный арабиногалактан AGS1. Количество нейтральных моносахаридных остатков, в частности, арабинозы и галактозы, в составе силенана SVS суспензионных клеток в среднем в 2-3 раза выше, чем в силенане каллусных клеток (табл. 10). SVS состоит в основном из слабо разветвленных пектиновых фрагментов с Mw > 300 кДа и более разветвленного пектинового полисахарида с Mw 100-300 кДа (табл. 10). При этом Mw силенана SVS (259 кДа) ниже, чем Mw SVC каллуса (416 кДа), что обусловлено смещением Mw-распределения в сторону меньшей Mw (100-300 кДа) в SVS.

Таблица 10. Характеристика полисахаридов, выделенных из суспензионной культуры смолевки обыкновенной

Фракция	Выход, %	GalA, %	Нейтральные моносахариды, %							Белок, %	Mw, кДа
			Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма		
SVS	3.0*	62.9	5.4	4.0	1.7	2.3	3.8	2.1	19.2	14.2	259
AGS	1.2*	5.3	27.1	15.1	4.0	6.2	4.6	5.5	62.5	21.3	50
AGS1		4.9	30.5	19.8	3.2	5.2	2.2	7.1	67.9	23.5	81
SVS-I ^a	72.1**	61.7	1.2	1.5	0.5	1.0	0.2	0.4	4.8	10.7	>300
SVS-II ^a	5.1**	26.4	6.5	4.7	1.2	2.1	7.2	1.0	22.7	1.3	100-300
AGS1-I ^a	35.9***	4.4	29.8	18.8	3.4	5.8	1.3	9.7	68.8	20.5	>300
AGS1-II ^a	23.2***	6.1	35.3	26.9	4.2	4.3	1.3	3.0	75.0	8.9	100-300
AGS1-III ^a	2.4***	5.8	19.1	8.5	2.8	6.5	6.0	3.3	46.2	7.6	50-100

Примечания: SVS – силенан из суспензионной культуры клеток,

AGS – внутриклеточный арабиногалактан, AGS1 – внеклеточный арабиногалактан.

^a – Фракции, полученные в результате ультрафильтрации.

* Выход от сухой биомассы. ** Выход от фракции SVS. *** Выход от фракции AGS1.

Арабиногалактаны AGS и AGS1 имеют сходное строение. При этом AGS1 обладает более высокой Mw (81 кДа) по сравнению с AGS (Mw 50 кДа). В то же время AGS и AGS1 отличаются повышенным содержанием остатков арабинозы и пониженным – остатков галактозы, а также более низкой Mw в сравнении с AG и AG1 каллусных культур, что связано со значительным снижением процентного содержания фракции с Mw >300 кДа (табл. 10). Изменения в строении силенана и арабиногалактанов, вероятно, связаны с морфо-физиологическими особенностями клеток в результате перехода клеток к глубинному культивированию.

Выход пектина от сухой биомассы в суспензионно культивируемых клетках составляет 3.0%, а продуцирование на 1 л среды – 0.18 г/л. Процентное содержание AGS равняется 1.2%, продуцирование на 1 л среды – 0.07 г/л. Количество AGS1 в среде составляет 0.58 г/л. Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание пектиновых веществ в клетках смолевки снижается при глубинном культивировании. Количество AGS1 в среде суспензионной культуры значительно выше, чем в клеточных стенках каллусных и суспензионных культур и в твердой питательной среде, что свидетельствует об интенсивной секреции арабиногалактанов в среду при глубинном культивировании.

Культура корней (*hairy roots*). Пектиновые вещества генетически трансформированной культуры корней смолевки обыкновенной представлены кислыми арабиногалактанами. В их составе доминируют остатки арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты (табл. 11). Подобные полисахариды ранее были выделены из других культур культур корней (Mort and Grover, 1988; Mishra et al., 2006).

Таблица 11. Характеристика полисахаридов, выделенных из культуры *hairy roots* смолевки обыкновенной

Фракция	GalA, %*	Нейтральные моносахариды, %							Белок, %
		Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man	Сумма	
AG-hr1	6.4	26.7	20.1	2.9	8.8	1.8	7.3	67.6	29.5
AG-hr2	14.4	13.5	14.5	2.2	2.4	2.0	3.0	37.6	13.2

Примечания: приведены средние значения из трех экспериментов.

Показано, что AG культуры корней близки по строению AGS суспензионной культуры, тогда как AG культуры корней и каллуса отличаются по содержанию моносахаридных остатков. Так, количество остатков арабинозы выше в 1.6-2.3 раза в AG из культуры корней, чем в AG из каллуса, тогда как содержание остатков галактозы выше в AG из каллуса в 1.5-3.0 раза, чем из культуры корней. Соотношение арабиноза/галактоза в среднем в 3.5 раза ниже в культуре корней, чем в каллусных клетках.

Суммарный выход AG (0.7%) культуры корней смолевки в 6-12 и 1.7 раза ниже, чем выход AG каллуса и AGS суспензионной культуры соответственно.

Таким образом, суспензионные, каллусные культуры и культуры корней смолевки обыкновенной продуцируют отличающиеся по строению пектиновые вещества. При изменении способа культивирования клеток *in vitro* (на твердой среде или глубинно) может меняться молекулярная масса полисахаридов и содержание остатков арабинозы и галактозы в них. Содержание пектиновых веществ в клетках снижается при глубинном культивировании, и происходит интенсивная секреция арабиногалактана в среду. Содержание AG в культуре корней значительно ниже, чем в клеточных культурах.

3. Модификация пектинов и арабиногалактанов каллусных культур с различным строением углеводной цепи под действием экзогенных гликаназ

Пектиназа. В результате действия пектиназы происходит снижение Mw силенана и лемнана, свидетельствующее о деполимеризации пектинов клеточной стенки. Показано более существенное снижение содержания остатков галактуроновой кислоты в лемнана (на 56%), чем в силенане (на 18-37%) под действием пектиназы, обусловленное меньшей степенью этерификации лемнана (рис. 1). Известно, что метилдеэтерификация пектина может усиливать его гидролиз за счет действия полигалактуроноаз или пектатлиаз (Sila et al., 2009). Снижение содержания остатков арабинозы в силенане (на 44%) и лемнана (на 70%) в присутствии 1-5 мг/мл пектиназы, свидетельствующее об отщеплении остатков арабинозы от боковых цепей RG-I, связано с увеличением активности α -L-арабинофуранозидазы. Более значительное снижение содержания остатков арабинозы в лемнана, вероятно, связано с большим количеством этих остатков, занимающих терминальное положение в составе боковых цепей лемнана. В присутствии пектиназы в низких концентрациях (10^{-3} - 10^{-1} мг/мл) получены образцы лемнана с повышенным содержанием остатков галактуроновой кислоты (на 13-28%) и увеличенной Mw и Mn, что связано с низкой активностью пектиназы и пектинэстеразы. Низкие концентрации пектиназы не влияют на строение силенана.

В составе AG смолевки содержание остатков арабинозы и галактозы снижается, соответственно, на 49-86% и 40-69% при концентрациях пектиназы 10^{-2} -5 и 1-5 мг/мл (рис. 1). Соотношение арабиноза/галактоза увеличивается (1:11.9-24.7). В AG1 смолевки содержание остатков арабинозы и галактозы снижается при концентрациях пектиназы 1-5 и 5 мг/мл соответственно.

Количество остатков арабинозы и галактозы в AG ряски уменьшается на 24-78 и 38% при концентрации фермента 4×10^{-3} -1 и 1 мг/мл соответственно (рис. 1). Соотношение арабиноза/галактоза с ростом концентрации пектиназы увеличивается от 1:3.4 до 1:7.6. При низких концентрациях пектиназы (10^{-3} - 10^{-2} мг/мл) получены AG ряски с увеличенным содержанием остатков галактозы, что может быть обусловлено снижением активности β -галактозидазы. В AG1 ряски содержание остатков арабинозы снижается на 51-67% при 10^{-2} -1 мг/мл фермента.

Более существенное снижение содержания остатков галактозы в AG и AG1 из каллуса смолевки, вероятно, обусловлено большим количеством остатков галактозы, занимающих терминальное положение в боковых цепях AG и AG1. Уменьшение содержания остатков арабинозы и галактозы в полисахаридах связано с увеличением активности внутриклеточной и внеклеточной α -L-арабинофуранозидазы и внеклеточной β -галактозидазы соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате действия α -L-арабинофуранозидазы происходит трансформация AG в галактан, а затем под действием галактозидазы – разрушение галактана.

β -галактозидаза. Под действием высоких концентраций фермента (1-5 мг/мл) наблюдается более существенное снижение содержания остатков галактозы в лемнана (на 67%), чем в силенане (на 30-46%) (рис. 2).

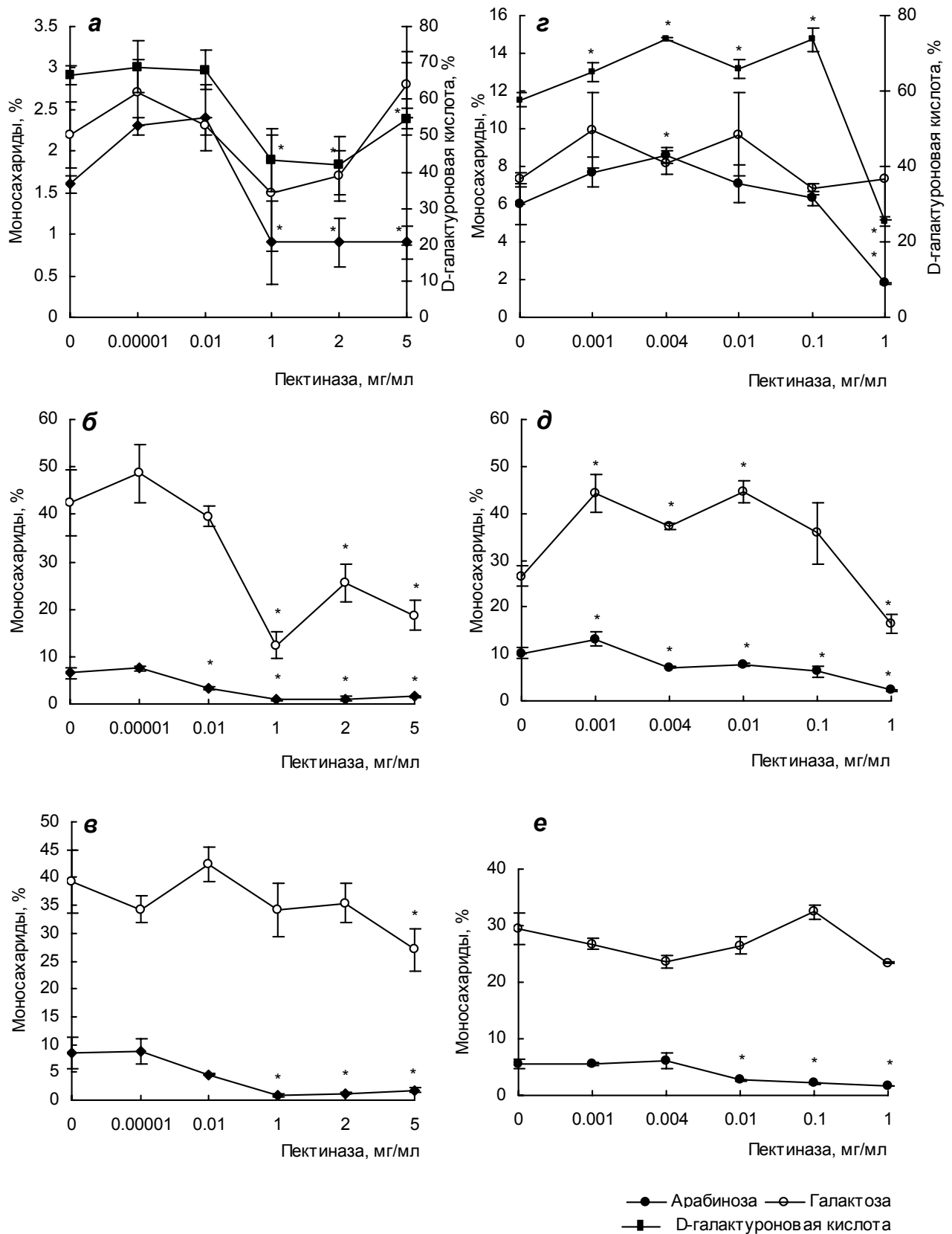


Рис. 1. Действие пектиназы на моносахаридный состав силенана (а), лемнана (г), внутриклеточного арабиногалактана из каллуса смолевки (б) и ряски (д), внеклеточного арабиногалактана из каллуса смолевки (в) и ряски (е).
* Различия достоверны при $p < 0.05$, контроль – отсутствие фермента.

Наблюдаемый эффект может быть связан с большим количеством остатков галактозы, которые могут занимать терминальное положение в составе боковых цепей лемнана. Кроме того, получены образцы силенана и лемнана со сниженным содержанием арабинозы на 68-73% и 74% соответственно. Отщепление остатков галактозы и арабинозы от боковых цепей RG-I, скорее всего, вызвано увеличением активности внутриклеточной и внеклеточной β -галактозидазы и α -L-арабинофуранозидазы при добавлении в среду галактозидазы. Более существенное снижение содержания остатков галактуроновой кислоты в силенане (на 19-29%), чем в лемнане (на 11%) является следствием значительного увеличения активности внутриклеточной и внеклеточной полигалактуроназы. В то же время активность полигалактуроназы каллуса ряски отсутствует или является очень низкой.

В присутствии β -галактозидазы в низких концентрациях (10^{-3} - 10^{-1} мг/мл) получены образцы лемнана с увеличенным на 9-46% содержанием остатков галактуроновой кислоты и сниженным на 46% количеством остатков галактозы (рис. 2). При этом основные изменения моносакхаридного состава пектина происходят в наиболее разветвленном фрагменте лемнана с Mw 100-300 кДа. Увеличение количества галактуроновой кислоты свидетельствует об увеличении содержания галактуронана в составе макромолекулы лемнана и связано с низкой активностью пектиназы и пектинэстеразы и повышенной активностью β -галактозидазы.

Снижение содержания остатков галактозы в AG (на 56-71%) и AG1 (на 39%) из каллуса смолевки при высоких концентрациях галактозидазы, по всей видимости, связано с большим количеством остатков галактозы (в том числе терминальных) в боковых цепях AG смолевки, чем AG ряски, а также с высокой активностью β -галактозидазы. Соотношение арабиноза/галактоза составляет 1:(21.2-34.4) и 1:11.2 в AG смолевки и ряски соответственно. Более существенное снижение содержания остатков арабинозы в AG смолевки (на 89-91%), чем в AG ряски (на 75%) при высоких концентрациях галактозидазы (1-5 мг/мл), вероятно, связаны с более высокой активностью α -L-арабинофуранозидазы.

В присутствии 1-5 мг/мл β -галактозидазы снижается содержание остатков арабинозы в AG1 смолевки на 87-95%, а в AG1 ряски на 92% (рис. 2). Кроме того, в отличие от AG1 смолевки количество остатков арабинозы в AG1 ряски уменьшается при низких концентрациях галактозидазы (10^{-3} - 10^{-1} мг/мл), что связано с увеличением активности α -L-арабинофуранозидазы в клетках. Смещение Mw-распределения AG1 ряски в сторону большей Mw (>300 кДа) связано с разрушением более разветвленных фрагментов с меньшей Mw (50-300 кДа) при 10^{-3} -1 мг/мл фермента.

Таким образом, степень модификации полисахаридов под действием гликаназ определяется особенностями их структуры, в частности, строением боковых цепей и степенью метилэтерификации. Добавление высоких концентраций пектиназы и β -галактозидазы в культуральную среду вызывает снижение молекулярной массы силенана и лемнана и содержания 1,4- α -D-галактуронана, снижение содержания остатков арабинозы и галактозы в боковых углеводных цепях разветвленной области RG-I и в макромолекуле арабиногалактана, образование и разрушение галактана. Присутствие в среде низких концентраций β -галактозидазы и пектиназы вызывает увеличение молекулярной массы и содержания 1,4- α -D-галактуронана в макромолекуле лемнана и снижение содержания остатков арабинозы в арабиногалактане.

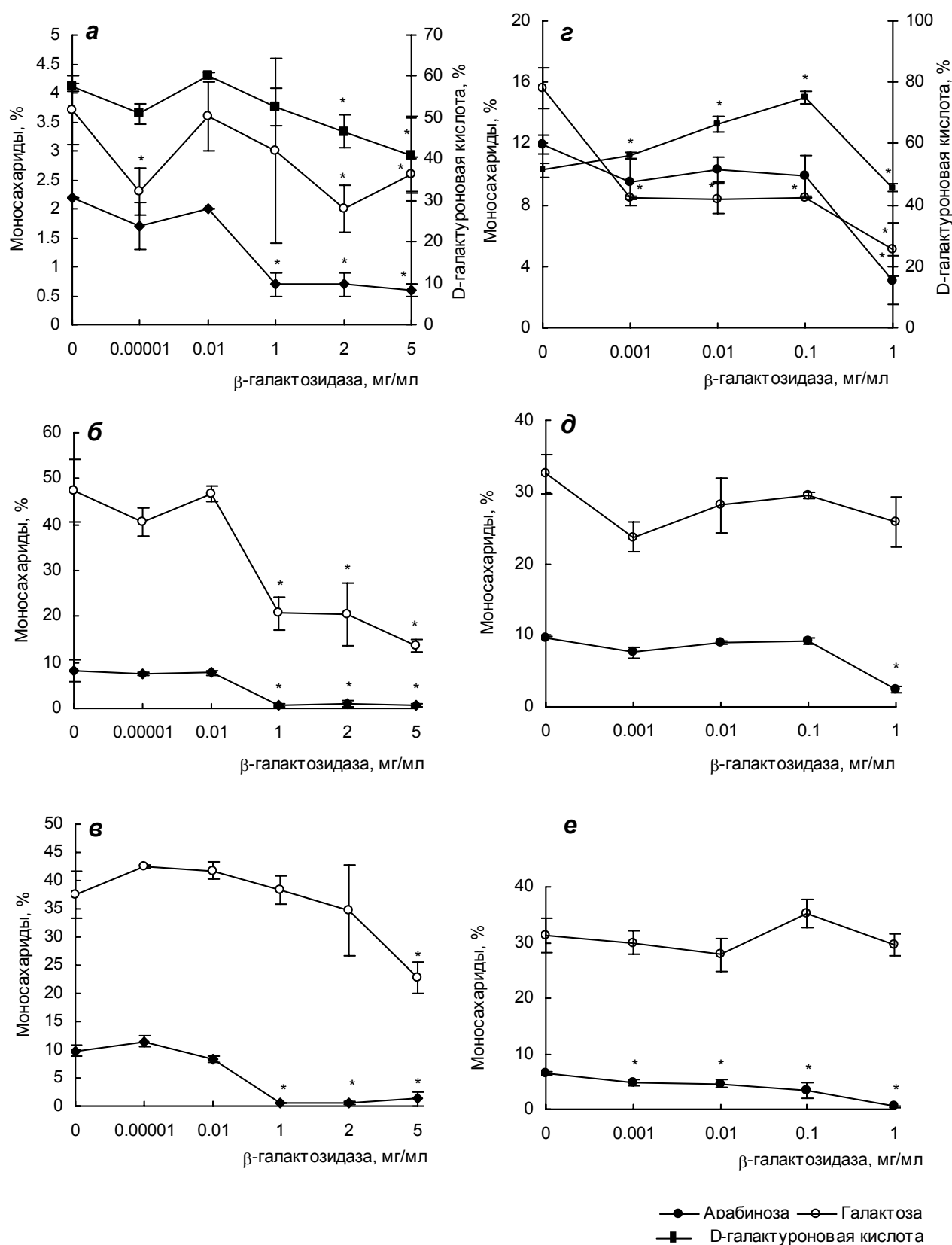


Рис. 2. Действие β-галактозидазы на моносахаридный состав силенана (а), лемнана (г), внутриклеточного арабиногалактана из каллуса смолевки (б) и ряски (д), внеклеточного арабиногалактана из каллуса смолевки (в) и ряски (е). * Различия достоверны при $p < 0.05$, контроль – отсутствие фермента.

4. Модификация пектинов и арабиногалактанов клеточных культур под действием трофических и гормональных факторов

При исследовании молекулярно-массового распределения силенана и АГ обнаружена положительная корреляция ($R = 0.99$ и $R = 0.85$, $p < 0.05$) между концентрацией сахарозы в среде и выходом фрагментов силенана и АГ с $M_w > 300$ кДа соответственно. Полученные данные свидетельствуют об увеличении выхода указанного фрагмента в силенане и АГ с ростом концентрации сахарозы в среде от 10 до 40 г/л и от 10 до 100 г/л соответственно. Для фрагментов с M_w 100-300 кДа и 50-100 кДа характерна отрицательная корреляция, что говорит о снижении процентного содержания фрагментов с меньшей M_w в силенане и АГ. Показано, что с увеличением концентрации сахарозы в среде возрастает содержание остатков арабинозы и галактозы во фрагментах силенана и АГ с $M_w > 300$ кДа. Для фракции АГ с M_w 100-300 кДа характерна тенденция к снижению содержания этих моносахаридных остатков. При увеличении концентрации сахарозы в среде от 10 до 40 г/л для фрагмента силенана с M_w 100-300 кДа наблюдается тенденция к увеличению содержания остатков арабинозы и галактозы, и к снижению числа остатков галактуроновой кислоты.

Увеличение выхода фрагментов силенана и АГ с $M_w > 300$ кДа и содержания в их составе остатков арабинозы и галактозы может быть связано с увеличением концентрации сахарозы в среде, являющейся донором UDP-глюкозы – ключевого моносахарида, из которого образуются другие моносахариды, участвующие в биосинтезе полисахаридов. Таким образом, при увеличении концентрации сахарозы синтезируется пектин и АГ с большим количеством боковых цепей, состоящих из остатков арабинозы и галактозы, и с большей M_w .

Выход фракции силенана с $M_w > 300$ кДа увеличивается на среде, содержащей глюкозу, смесь сахарозы и арабинозы, повышенные концентрации кальция (4.5 мМ) и азота (90 мМ) (рис. 3а). Выход фракции АГ с $M_w > 300$ кДа увеличивается на среде с добавлением смеси сахарозы и арабинозы, сахарозы и глюкозы, галактозы, 2,4-Д. Содержание остатков арабинозы в силенане и АГ с $M_w > 300$ кДа увеличивается в присутствии 2,4-Д или смеси сахарозы и арабинозы, что указывает на биосинтез пектина с более высоким содержанием нейтральных боковых цепей и увеличение арабинозных групп на коре галактана (рис. 3б,в). Снижение содержания остатков арабинозы и галактозы при увеличении концентрации кальция и азота в среде указывает на отщепление боковых цепей силенана или уменьшение их длины (рис. 3б).

На среде, содержащей галактозу, увеличивается содержание остатков галактозы и арабинозы в АГ с $M_w > 300$ кДа. При недостатке в среде азота или фосфата снижающееся содержание остатков арабинозы и/или галактозы во фракции АГ с $M_w > 300$ кДа указывает на деградацию полисахарида (рис. 3в).

Таким образом, количество полисахаридных цепей пектина и арабиногалактана с молекулярной массой более 300 кДа и содержание остатков арабинозы и галактозы в их боковых углеводных цепях увеличивается при добавлении в культуральную среду арабинозы, галактозы, сахарозы и 2,4-Д.

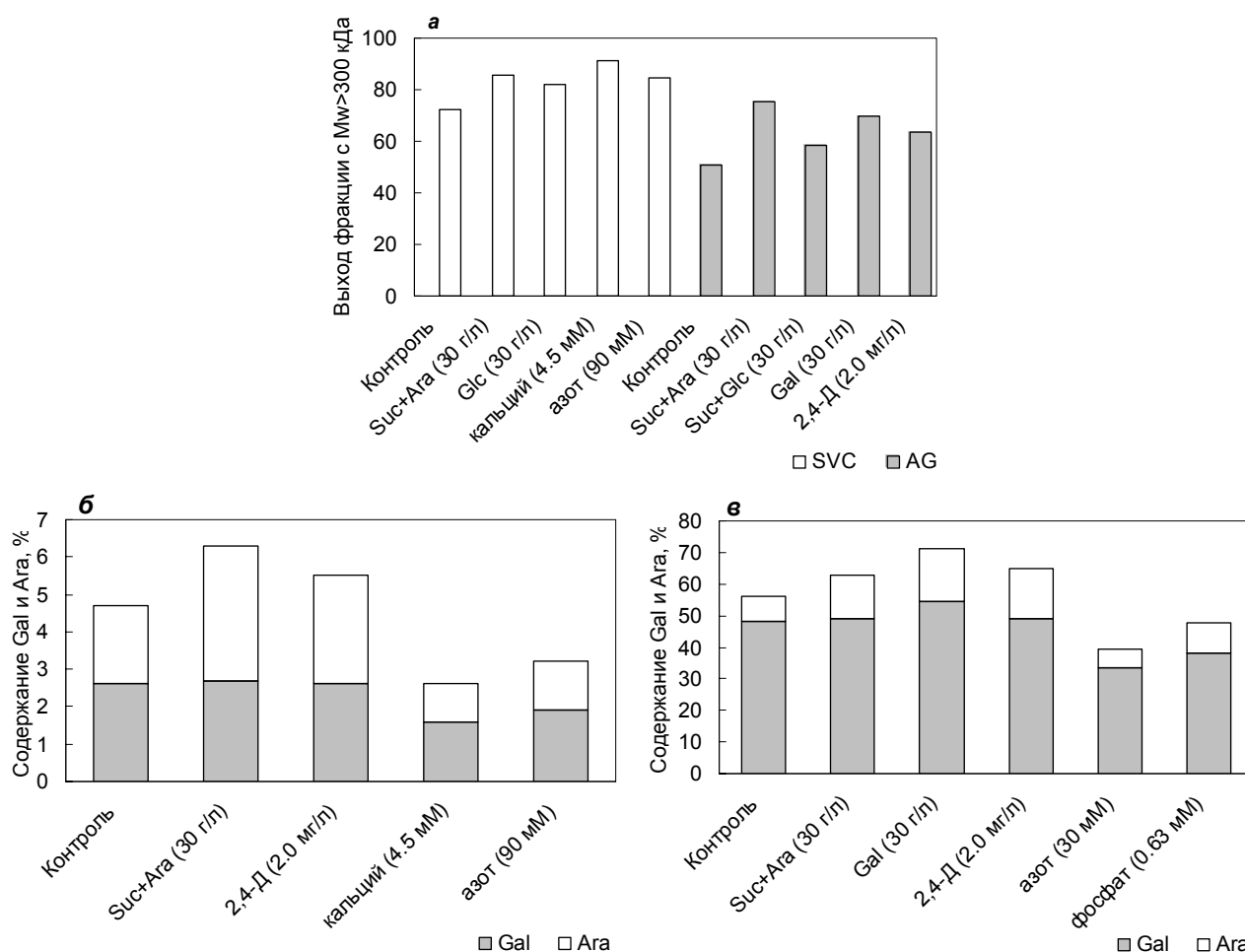


Рис. 3. Влияние компонентов питательной среды на выход (а) и моносахаридный состав фракций силенана SVC (б) и арабиногалактана AG (в), полученных после фракционирования на ультрафильтрационных мембранах. Контроль: 2,4-Д, 1.0 мг/л; сахара, 30 г/л; азот, 60 мМ; кальций, 3.0 мМ.

5. Действие УФ-облучения на физиолого-биохимические характеристики каллусной культуры *S. vulgaris*

УФ-В ($\lambda = 280-315$ нм). Облучение культур клеток смолевки различными дозами УФ-В в диапазоне от 0.63 до 2.18 Вт/м² в течение 1 ч и от 0.2 до 13.0 Вт/м² в течение 3 ч показало, что продолжительность экспозиции существенно не влияет на ростовые характеристики клеток, выход и продуктивность силенана и AG, тогда как варьирование интенсивности облучения вызывает изменения в содержании полисахаридов. Наибольшие выходы пектина (11-12%) и продуктивность на литр среды (0.8-0.9 г/л) отмечены при мощности облучения 0.63 и 1.4 Вт/м² (экспозиция 1 и 3 ч). Увеличение выхода AG наблюдается при 0.83 Вт/м² при 1 ч экспозиции, а также при 0.2-0.5, 2.18 и 13 Вт/м² при 3 ч экспозиции. Содержание AG на 1 л среды возрастает при 0.2, 0.3 и 2.18 Вт/м² после 3 ч экспозиции. Методами кислотного гидролиза и ионообменной хроматографии установлено, что облучение вызывает снижение содержания остатков арабинозы и галактозы в силенане, особенно при высоких дозах облучения и экспозиции 3 ч – 0.63-13.0 Вт/м² и 1.4-13.0 Вт/м² соответственно. При некоторых дозах облучения (0.63, 0.83, 3.4 и 7.7 Вт/м²) отмечено существенное снижение количества остатков арабинозы в AG. Полученные данные свидетельствуют о том, что под воздействием УФ-В может происходить

нарушение биосинтеза боковых цепей пектина и AG, а также постсинтетическая модификация полисахаридов, включающая отщепление остатков арабинозы и галактозы от их боковых цепей.

УФ-С ($\lambda=254$ нм). Изменение продолжительности облучения УФ-С (10-60 мин) не влияет на содержание полисахаридов в каллусе смолевки, но оказывает действие на моносахаридный состав полисахаридов и активность гликаназ клеток. Содержание остатков арабинозы и галактозы в силенане и остатков арабинозы в AG из каллуса, облученного УФ-С (доза 70 Вт/м²) в середине экспоненциальной фазы роста (12 сут) снижается на стационарной фазе роста клеток (21 сут) независимо от продолжительности экспозиции (рис. 4). Изменения в моносахаридном составе полисахаридов сохраняются в течение длительного культивирования клеток. Уменьшение содержания остатков арабинозы и галактозы в полисахаридах вследствие облучения связано с увеличением активности α -L-арабинофуранозидазы и β -галактозидазы соответственно. В облученных клетках степень этерификации силена снижается в три раза, что сопровождается увеличением активности пектинэстеразы.

Таким образом, под воздействием УФ-облучения происходит активация α -L-арабинофуранозидазы, β -галактозидазы и пектинэстеразы, метилдэтерификация пектина и разрушение боковых цепей пектина и AG клеточных стенок.

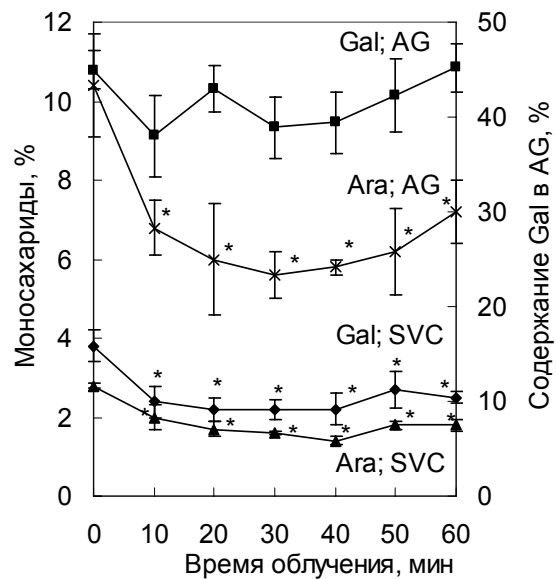


Рис. 4. Влияние УФ-С на содержание галактозы (Gal) и арабинозы (Ara) в силенане (SVC) и арабиногалактане (AG). * Различия достоверны при $p < 0.05$, контроль — необлученные клетки.

6. Действие фитопатогенных грибов и элиситоров на полисахаридный состав и активность гликаназ каллусной культуры *S. vulgaris*

Фитопатогенные грибы. Исследована модификация пектина и AG каллуса смолевки обыкновенной в результате сокультивирования с фитопатогенными грибами *P. dierckxii*, *A. niger*, *T. harzianum* и *Fusarium* sp. и индукция ферментов, разрушающих клеточную стенку (рис. 5). Увеличение выхода пектина в совместной культуре с *P. dierckxii*, *T. harzianum* и *Fusarium* sp. может свидетельствовать о секреции растительной клеткой нового материала клеточной стенки в область ее деградации. Содержание AG в каллусе существенно не изменяется. Продуцирование внеклеточного AG1 на литр среды снижается при сокультивировании каллуса с *P. dierckxii*, *T. harzianum* и *A. niger*, что указывает на его деградацию в результате патогенеза.

Снижение выхода фракции силенана с $M_w > 300$ кДа и сдвиг M_w -распределения в сторону увеличения выхода фракций с меньшей M_w (100-300 и 50-100 кДа) указывает на деполимеризацию пектинов клеточной стенки при сокультивировании каллуса с *P. dierckxii*, *Fusarium* sp. и *A. niger*. Снижение содержания остатков галактуроновой кислоты в пектине в 1.2-1.4 раза (рис. 6а) при сокульти-

вировании каллуса с *T. harzianum*, *Fusarium* sp. и *A. niger* может быть вызвано увеличением активности полигалактуроназы как гриба, так и каллуса (рис. 6б). Для *P. dierckxii* и *Fusarium* sp. характерна высокая активность внутриклеточной и внеклеточной полигалактуроназы, а для *T. harzianum* – внеклеточной полигалактуроназы как до, так и после сокультивирования с каллусом. В результате сокультивирования в мицелии *A. niger* происходит увеличение активности внутриклеточной и внеклеточной полигалактуроназы. Данные свидетельствуют о снижении содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле.

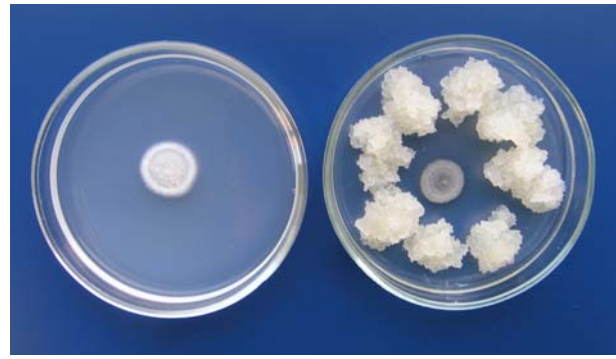


Рис. 5. Сокультивирование каллуса *S. vulgaris* с *Aspergillus niger*

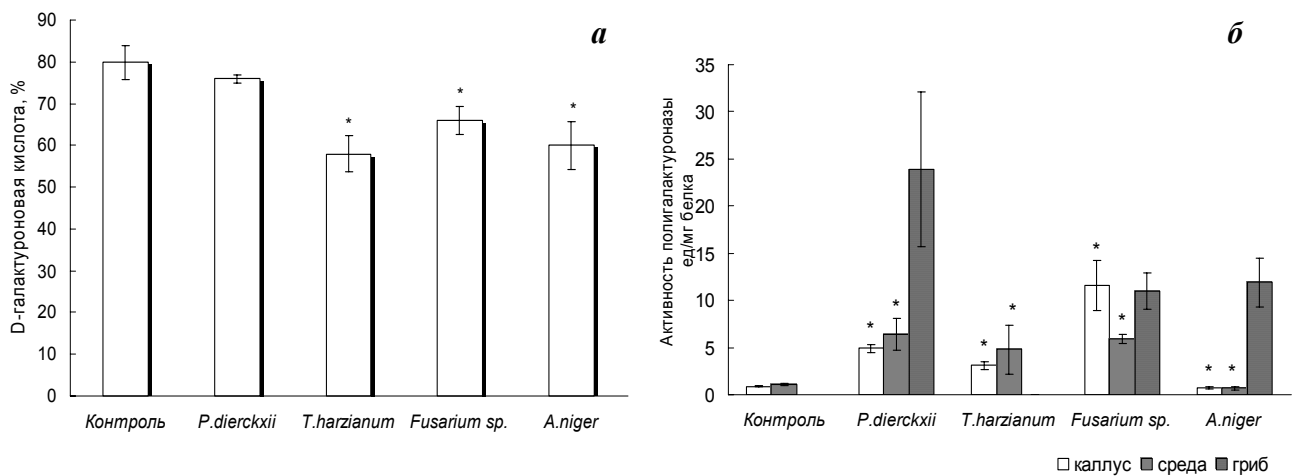


Рис. 6. Влияние сокультивирования каллуса смолевки с фитопатогенными грибами на содержание остатков D-галактуроновой кислоты в силенане (а) и на активность полигалактуроназы в каллусе, среде и мицелии (б). * Различия достоверны при $p < 0.05$, контроль – неинфицированный каллус.

Сокультивирование каллуса смолевки с *P. dierckxii*, *T. harzianum* и *A. niger* вызывает увеличение активности 1,3- β -глюканазы в каллусе. Полученные данные свидетельствуют о проявлении клетками защитного механизма, включающего в себя синтез защитных PR-белков – 1,3- β -глюканаз, которые способны гидролизовать компоненты клеточных стенок фитопатогенов. Различия в активности ферментов патогенных грибов, проявляемые при сокультивировании с растительными клетками, являются результатом различных взаимоотношений хозяин-патоген, которые определяются специфичностью патогена (Miedes and Lorences, 2006).

Таким образом, сокультивирование каллусных клеток с фитопатогенными грибами вызывает снижение молекулярной массы пектина и содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле. Модификация строения пектинов клеточной стенки обусловлена изменением активности гликаназ как мицелиальных так и растительных клеток.

Действие элиситора из *Aspergillus niger*. В качестве элиситора использовали компоненты клеточных стенок микромицета *A. niger*: галактоманнан и глюкан. Показано, что в присутствии элиситора (1.9-177 мг/л) процентное содержание силенана в клетках снижается в 1.6-2.7 раза, выход АГ существенно не изменяется, а

продукция AG и AG1 на литр среды увеличивается в 1.5-2.2 раза по сравнению с контролем.

Снижение в присутствии элиситора Mn, а также Mw силенана при низкой и высокой концентрациях элиситора (табл. 12), вероятно, обусловлено увеличением активности полигалактуроназы в каллусе. Последняя, скорее всего, вызывает снижение содержания остатков галактуроновой кислоты в пектине при низких и средних концентрациях элиситора. Кроме того, увеличивается активность пектинметилэстеразы, которая удаляет метильные группы пектина, в результате чего усиливается гидролиз этого полимера под действием полигалактуроназы. Содержание остатков арабинозы в AG1 увеличивается в 1.4-2.0 раза при концентрациях 11-177 мг/л, что свидетельствует о биосинтезе AG1 с более высоким содержанием остатков арабинозы в боковых цепях. Увеличение активности 1,3-β-глюканазы при средних и высоких концентрациях элиситора свидетельствует о проявлении клетками защитного механизма.

Таблица 12. Влияние элиситоров на молекулярную массу и содержание галактуроновой кислоты в силенане

Элиситор из <i>A. niger</i>				Элиситор из <i>M. silenes</i>			
Концентрация элиситора, мг/л	Mw, кДа	Mn, кДа	GalA, %	Концентрация элиситора, мг/л	Mw, кДа	Mn, кДа	GalA, %
0 (Контроль)	313	48.9	78.0	0 (Контроль)	313	48.9	75.0
1.9	169	33.2	66.6*	0.3	352	29.0	52.7*
11	н.о.	н.о.	66.0*	2.8	188	15.9	47.0*
27	418	29.5	62.7*	8.5	227	18.1	54.9*
105	303	26.7	68.4	21	213	11.6	46.7*
177	155	27.0	81.0				

Примечания: * Различия достоверны при $p < 0.05$, контроль – отсутствие элиситора; н.о. – не определено.

Действие элиситора из *Microbotryum silenes*. В присутствии глюкана, элиситора из *M. silenes*, являющегося облигатным патогенным растений сем. *Caryophyllaceae*, выход силенана увеличивается в 1.3-1.7 раза, выход AG и продуцирование AG и AG1 на литр среды существенно не изменяются. При добавлении элиситора снижается Mn силенана, а также его Mw при концентрациях 2.8-21 мг/мл, что свидетельствует о деполимеризации пектинов клеточной стенки (табл. 12). При этом в присутствии элиситора активность полигалактуроназы в клетках снижается, что, вероятно, связано с ранее отмеченным явлением (Fry, 2004) несовпадения наблюдаемого *in vivo* эффекта и выявляемой *in vitro* активности.

Снижение содержания остатков галактуроновой кислоты в пектине, указывающее на снижение содержания 1,4-α-D-галактуронана в пектине, вероятно, связано с увеличением активности внеклеточной полигалактуроназы (табл. 12). Уменьшение количества остатков галактозы и арабинозы в силенане связано с ростом активности внутриклеточной и/или внеклеточной β-галактозидазы и α-L-арабинофуранозидазы соответственно. Полученные данные свидетельствуют об укорочении или разрушении боковых углеводных цепей RG-I под действием элиситора. Содержание остатков арабинозы в AG1 увеличивается при низких концентрациях элиситора (0.3 и 2.8 мг/л). Увеличение количества остатков галактуроновой кислоты в AG и AG1 связано со снижением активности полигалактуроназы в

каллусе при добавлении элиситора. Активность внутриклеточной и внеклеточной 1,3- β -глюканазы увеличивается при низких и средних концентрациях элиситора.

Таким образом, культивирование каллуса смолевки на среде с компонентами клеточных стенок микромицетов (элиситорами) вызывает изменения в продуцировании и в их моносахаридном составе пектина и AG, снижает молекулярную массу пектина и содержание галактуронана в нем, а также индуцирует активность гликаназ, которые принимают непосредственное участие в модификации структуры пектиновых веществ.

Выявлены однотипные изменения в клеточных стенках растительных клеток при действии различных фитопатогенных грибов и элиситоров, которые включают снижение молекулярной массы пектина и содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле.

7. Роль агробактериальных генов *rol* в регуляции биосинтеза растительных полисахаридов

Проведен сравнительный анализ действия трансформации генами *rolA*, *rolB* и *rolC* на активность гликаназ, содержание и строение пектиновых веществ каллусных культур марены сердцелистной *Rubia cordifolia*, женьшеня *Panax ginseng*, родиолы розовой *Rhodiola rosea*, винограда амурского *Vitis amurensis* и смолевки обыкновенной *Silene vulgaris*, а также суспензионной культуры марены и культуры корней женьшеня.

Пектин. Выявлено, что выход пектина в трансгенных культурах изменяется в зависимости от типа гена. Трансформация генами *rolA*, *rolB* и диким штаммом *A. rhizogenes* не оказывает существенного влияния на выход пектина. Ген *rolC* проявляет ингибирующее действие на продуцирование пектинов, которое зависит от силы экспрессии гена: снижение уровня биосинтеза пектина характерно только для трансгенов марены и женьшеня с высокой экспрессией гена, а также для трансгенов родиолы и смолевки. Однако появление признаков дифференциации клеток (образование корней в линиях марены) в *rolC* трансгенах отменяет ингибирующий эффект гена.

Трансформация генами *rol* вызывает уменьшение содержания остатков галактуроновой кислоты в пектинах *rolA* и совместно экспрессирующих гены *rol* трансгенов марены; *rolB* трансгенов марены, винограда и смолевки; *rolC* трансгенов марены, женьшеня, родиолы и смолевки. При этом с увеличением силы экспрессии гена *rolB* в линиях марены и винограда и гена *rolC* в линиях марены и женьшеня происходит более существенное снижение ее содержания. Данные свидетельствуют о том, что под действием генов *rol* происходит снижение содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле.

Трансформация геном *rolA* и диким штаммом *A. rhizogenes* не влияет на состав нейтральных моносахаридных остатков пектина. Количество остатков арабинозы и галактозы не изменяется в пектинах культур родиолы и винограда, трансформированных геном *rolB*, тогда как увеличивается в клетках смолевки, что может быть обусловлено снижением активности α -L-арабинофуранозидазы. Кроме того, с увеличением силы экспрессии гена *rolB* происходит более существенное снижение содержания остатков арабинозы и увеличение остатков галактозы в пектине марены, что, вероятно, обусловлено появлением активности α -L-арабинофуранозидазы в клетках и снижением активности β -галактозидазы.

При трансформации геном *rolC* количество остатков арабинозы в пектинах культур марены и родиолы снижается, тогда как не изменяется в пектине женьшеня, увеличивается в силенане и сопровождается уменьшением активности α -L-арабинофуранозидазы в клетках смолевки. С увеличением силы экспрессии гена *rolC* происходит более существенное снижение содержания остатков арабинозы в пектине марены, что связано с появлением активности α -L-арабинофуранозидазы в клетках. Содержание остатков галактозы увеличивается в силенане и сопровождается снижением активности β -галактозидазы, а также в пектине из каллуса женьшеня с высокой экспрессией гена *rolC*.

Увеличение содержания остатков арабинозы и галактозы в силенане из *rolB* и *rolC* трансгенов смолевки свидетельствует об увеличении содержания боковых цепей в разветвленной области RG-I.

Арабиногалактан. Показано, что нет четкой зависимости процентного содержания AG в трансгенных клетках от типа гена. В *rolB* трансгенах наблюдается как увеличение выхода AG (клетки марены и родиолы), так и его снижение (клетки винограда), а также постоянный уровень биосинтеза (клетки смолевки). В *rolC* трансгенах большинства линий выход AG не изменяется, за исключением его увеличения в линиях марены с низкой экспрессией гена и родиолы. Совместная экспрессия генов *rol* в культуре RA4 марены приводит к увеличению продукции AG.

Выявлено снижение содержания остатков арабинозы в AG *rolA*, *rolB*, *rolC* и совместно экспрессирующих гены *rol* трансгенов марены, а также уменьшение количества остатков арабинозы и галактозы в AG *rolB* трансгенов винограда. Изменения в моносахаридном составе AG сопровождаются появлением активности α -L-арабинофуранозидазы в клетках марены и увеличением активности β -галактозидазы в клетках винограда с высокой экспрессией гена *rolB*. Трансформация генами *rol* не оказывает существенного влияния на содержание остатков галактозы и арабинозы в AG родиолы, женьшеня и смолевки.

Таким образом, при трансформации генами *rol* во многих случаях не наблюдается зависимости содержания остатков арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты в полисахаридах от активности гликаназ в клетках. В большинстве случаев трансформация геном *rolA* вызывает увеличение активности α -L-арабинофуранозидазы, снижение активности полигалактуроназы и 1,3- β -D-глюканазы; трансформация геном *rolB* индуцирует увеличение активности пектинэстеразы, снижение активности полигалактуроназы, α -L-арабинофуранозидазы и 1,3- β -D-глюканазы; трансформация геном *rolC* стимулирует увеличение активности пектинэстеразы и 1,3- β -D-глюканазы. Трансформация генами *rol* оказывает неоднозначное влияние на активность гликаназ и на структуру пектиновых веществ.

Хотя механизм действия генов *rol* в трансгенных растениях еще неясен, но некоторые фенотипические изменения могут указывать на биохимический эффект генов на эндогенные гормоны через изменение гормонального баланса или чувствительности к свободным активным гормонам (Bettini et al., 2010). Нами показано, что *rolB* и *rolC* гены ингибируют рост клеток смолевки обыкновенной, что, скорее всего, связано с действием генов на уровень и баланс эндогенных гормонов в клетках.

Итак, показано, что содержание и моносахаридный состав полисахаридов в культурах клеток, трансформированных агробактериальными генами *rolA*, *rolB* и *rolC*, изменяются в зависимости от типа гена и силы экспрессии трансгена. Механизм действия генов *rol* может заключаться как в регуляции активности гликаназ и эстераз, которые оказывают гидролитическое действие на полисахариды расти-

тельных клеток, тем самым, модифицируя их структуру, так и в регуляторном эффекте генов на эндогенные гормоны, которые стимулируют перенос UDP-сахаров в полимеры клеточной стенки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительная физиолого-биохимическая характеристика культур клеток и нативных растений выявила, что клеточные культуры смолевки, пижмы и ряски, подобно нативным растениям, синтезируют пектиновые вещества, представленные гомогалактуронанами и RG-I. При этом содержание полисахаридов в культурах клеток может значительно превышать таковое в нативных растениях. Дедифференцированные клетки разных видов и классов растений могут продуцировать пектины как близкие, так и отличные от пектинов нативных растений. Пектины каллусных культур, подобно пектинам нативных растений, состоят из линейных и разветвленных областей. Содержание линейного 1,4- α -D-галактуронана варьирует в пектинах из различных клеточных культур. Разветвленная область макромолекулы представлена RG-I, который отличается разнообразием структуры для разных пектинов. Пектины из каллусных культур разных видов растений отличаются по молекулярной массе, степени метилэтерификации и строению боковых цепей. С помощью каллусных культур показано, что пектины водных растений отличаются более развитой разветвленной областью макромолекулы RG-I, чем пектины наземных растений.

Выявлены отличия в строении пектинов каллуса ряски малой и смолевки татарской от нативного растения. В частности, пектины, полученные из каллусов и из нативных растений, отличаются строением разветвленной области макромолекулы. Лемнан из каллуса, по сравнению с нативным растением, отличается большим содержанием остатков галактозы и арабинозы в боковых углеводных цепях RG-I и меньшим содержанием остатков апиозы. Силенан из каллуса отличается более высокой молекулярной массой и большим содержанием остатков галактозы и арабинозы, а также более низким содержанием остатков галактуроновой кислоты по сравнению с силенаном из нативного растения.

Полученные данные указывают с одной стороны на общность процессов биосинтеза полисахаридов в культуре клеток и в нативном растении. В то же время, существуют особенности биосинтеза и постсинтетической модификации пектиновых веществ в культивируемых клетках растений, которые, по-видимому, связаны с переходом клеток к дедифференцированному состоянию, их генетическими особенностями и с условиями культивирования каллусных культур.

Показано, что изменение компонентного состава питательной среды (трофических и гормональных факторов) приводит к модификации моносакхаридного состава макромолекул пектина и AG и изменению их молекулярно-массового распределения. Выявлено, что механизм реагирования клеточной стенки растения на такое экстремальное воздействие, как ультрафиолетовое излучение включает изменение структуры макромолекул пектиновых веществ, которое обусловлено активацией гликаназ и эстераз (α -L-арабинофуранозидазы, β -галактозидазы и пектинэстеразы). Активирование или ингибирование активности гликаназ мицелиальных и растительных клеток при патогенезе растений может использоваться как эволюционно закрепленный естественный механизм для регуляции строения пектиновых веществ (изменения молекулярной массы и моносакхаридного состава). К разряду постсинтетических модификаций можно отнести действие экзогенных

гликаназ на растительные клеточные стенки. Степень модификации полисахаридов под действием гликаназ определяется особенностями их структуры, в частности, строением боковых цепей и степенью метилэтерификации.

Перспективным направлением представляется модификация строения пектиновых веществ в результате генетических манипуляций, а именно, экспрессии в растениях чужеродных генов, кодирующих активность гликаназ. В частности, выявлено, что механизм действия агробактериальных генов *rol* может заключаться как в регуляции активности гликаназ и эстераз, так и в регуляторном эффекте генов на эндогенные гормоны.

На основании экспериментальных данных можно заключить, что активация гликаназ и эстераз вовлечена в процессы постсинтетической модификации пектиновых веществ клеточной стенки и, вероятно, является частью адаптационной программы растений, подвергшихся воздействию неблагоприятных факторов, что важно для исследования такой функции клеточной стенки, как устойчивости к неблагоприятным воздействиям среды.

На основании полученных данных разработана стратегия биотехнологического получения пектинов и арабиногалактанов с модифицированным строением. Стратегия, в основе которой лежит направленная модуляция активности ферментов клеточной стенки, включает в себя следующие подходы:

- культивирование каллусных клеток с фитопатогенными грибами или их трансформацию агробактериальным геном *rolC* с целью снижения или увеличения молекулярной массы пектина соответственно;
- добавление β -галактозидазы, кальция и азота или пектиназы в среду культивирования каллусных клеток с целью увеличения или снижения содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле соответственно;
- облучение растительных клеток УФ-С с целью снижения степени метилэтерификации остатков галактуроновой кислоты пектиновой макромолекулы;
- добавление пектиназы и β -галактозидазы в среду культивирования каллусных клеток с целью снижения содержания галактозы в боковых углеводных цепях разветвленной области RG-I и в макромолекуле AG;
- добавление пектиназы и β -галактозидазы в культуральную среду с целью увеличения молекулярной массы AG.

Таким образом, абиотические и биотические факторы, вызывающие преобразование пектиновых веществ, могут быть использованы как инструмент для модификации структурных особенностей полисахаридов клеточных стенок с целью получения физиологически активных полисахаридов с заданной структурой и свойствами.

Полученные данные позволяют сформулировать концепцию: реализация механизма реагирования растительных клеток на абиотические и биотические факторы осуществляется путем увеличения или снижения активности гликаназ и эстераз клетки, которые оказывают влияние на постсинтетическую модификацию пектиновых веществ клеточной стенки, в частности, содержание 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле, молекулярную массу пектина, степень метилэтерификации остатков галактуроновой кислоты пектиновой макромолекулы, содержание остатков галактозы и арабинозы в боковых углеводных цепях пектина и в макромолекуле арабиногалактана.

ВЫВОДЫ

1. Культуры клеток по содержанию полисахаридов сравнимы с нативными растениями или заметно превосходят их. Пектины, синтезируемые клеточными культурами, представлены гомогалактуронанами и рамногалактуронанами I. Разветвленная область макромолекулы пектинов каллусных культур характеризуется более высоким содержанием остатков арабинозы и галактозы.

2. Каллусные культуры, наряду с пектином, характерным для нативных растений, синтезируют кислые арабиногалактаны, которые секретируются в культуральную среду и отличаются по молекулярной массе и строению боковых цепей.

3. Суспензионные и каллусные культуры смолевки обыкновенной продуцируют пектиновые вещества, отличающиеся по строению, содержание которых в клетках снижается при глубинном культивировании, и осуществляется интенсивная секреция арабиногалактана в среду. Культура корней смолевки обыкновенной продуцирует кислые арабиногалактаны, содержание которых значительно ниже, чем в клеточных культурах. Арабиногалактаны культуры корней близки по строению арабиногалактанам суспензионной культуры и отличаются повышенным содержанием остатков арабинозы и пониженным – остатков галактозы в сравнении с каллусами.

4. Реакция растительных клеток на добавление пектиназы и β -галактозидазы в высоких концентрациях в культуральную среду включает увеличение активности α -L-арабинофуранозидазы, β -галактозидазы и полигалактуроназы, снижение молекулярной массы пектина и содержания 1,4- α -D-галактуронана, снижение содержания остатков арабинозы и галактозы в боковых углеводных цепях разветвленной области RG-I и в макромолекуле арабиногалактана, образование и разрушение галактана. Степень модификации полисахаридов под действием гликаназ определяется особенностями их структуры, в частности, строением боковых цепей и степенью метилэтерификации.

5. Количество полисахаридных цепей пектина и арабиногалактана с молекулярной массой более 300 кДа и содержание остатков арабинозы и галактозы в их боковых углеводных цепях увеличивается при добавлении в культуральную среду арабинозы, галактозы, сахарозы и 2,4-Д.

6. УФ-облучение (длина волны 254 и 280-315 нм) каллуса приводит к активации α -L-арабинофуранозидазы, β -галактозидазы и пектинэстеразы, метилдеэтерификации пектина и разрушению боковых цепей пектина и арабиногалактана клеточных стенок.

7. Сокультивирование каллусных клеток с фитопатогенными грибами вызывает снижение молекулярной массы пектина и содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле. Модификация строения пектинов клеточной стенки обусловлена изменением активности гликаназ как мицелиальных так и растительных клеток.

8. Содержание и моносахаридный состав полисахаридов в культурах клеток, трансформированных агробактериальными генами *rolA*, *rolB* и *rolC*, изменяется в зависимости от типа гена и силы экспрессии трансгена. Механизм действия генов может заключаться как в регуляции активности гликаназ и эстераз, так и в регуляторном эффекте генов на эндогенные гормоны.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах и сборниках научных трудов

1. Гюнтер Е.А. (Мишарина) Каллусообразование *Silene vulgaris* (Moench) Garcke *in vitro* / **Е.А. Гюнтер** (Мишарина), Р.Г. Оводова, О.А. Бушнева, Ю.С. Оводов // Раст. ресурсы. - 1999. - Т. 35. - № 2. - С. 88-95 (перечень ВАК), автора – 0.75 пл.
2. Günter E.A. Changes in cell wall polysaccharides of *Silene vulgaris* callus during culture / **Е.А. Günter**, Yu.S. Ovodov // Phytochemistry. - 2002. - V. 59. - P. 703-708 (перечень ВАК), автора – 0.75 пл.
3. Günter E.A. An alternative carbon source for enhancing production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus / **Е.А. Günter**, Yu.S. Ovodov // Carbohydr. Res. - 2002. - V. 337. - P. 1641-1645 (перечень ВАК), автора – 0.85 пл.
4. Винтер В.Г. Полисахариды высших растений как факторы регуляции вторичного метаболизма / В.Г. Винтер, Р.Г. Оводова, **Е.А. Гюнтер**, Р.Ю. Козлова, Ю.С. Оводов // ДАН. - 2002. - Т. 387. - № 1. - С. 1-2 (перечень ВАК), автора – 0.25 пл.
5. **Гюнтер Е.А.** Получение каллусных культур *Silene vulgaris* (М.) G. // Биотехнология. - 2002. - № 6. - С. 41-45 (перечень ВАК), автора – 1.0 пл.
6. Гюнтер Е.А. Продукция полисахаридов каллусной культурой *Silene vulgaris* в зависимости от углеводов среды / **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Биохимия. - 2003. - Т. 68. - № 8. - С. 1079-1087 (перечень ВАК), автора – 0.85 пл.
7. Гюнтер Е.А. Получение полисахаридов из каллусной культуры *Lemna minor* L. / **Е.А. Гюнтер**, О.В. Попейко, Ю.С. Оводов // Прикл. биохим. микробиол. - 2004. - Т. 40. - № 1. - С. 94-97 (перечень ВАК), автора – 0.75 пл.
8. Günter E.A. Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture / **Е.А. Günter**, Yu.S. Ovodov // J. Biotechnol. - 2005. - V. 117. - P. 385-393 (перечень ВАК), автора – 0.85 пл.
9. Бушнева О.А. Структурное исследование арабиногалактана и пектина из каллуса *Silene vulgaris* / О.А. Бушнева, Р.Г. Оводова, А.С. Шашков, А.О. Чижов, **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Биохимия. - 2006. - Т. 71. - № 6. - С. 798-807 (перечень ВАК), автора – 0.2 пл.
10. Popov S.V. Adjuvant effect of lemnan, pectic polysaccharide of callus culture of *Lemna minor* L. at oral administration / S.V. Popov, **Е.А. Günter**, P.A. Markov, V.V. Smirnov, D.S. Khranova, Yu.S. Ovodov // Immunopharmacol. Immunotoxicol. - 2006. - V. 28. - P. 141-152 (перечень ВАК), автора – 0.2 пл.
11. Günter E.A. Influence of ultraviolet-C on the compositions of cell-wall polysaccharides and carbohydrase activities of *Silene vulgaris* callus / **Е.А. Günter**, O.M. Kapustina, O.V. Poreyko, Yu.S. Ovodov // Carbohydr. Res. - 2007. - V. 342. - P. 182-189 (перечень ВАК), автора – 0.6 пл.
12. Гюнтер Е.А. Модификация полисахаридов каллусной культуры *Silene vulgaris* (М.) G. с помощью карбогидраз *in vitro* / **Е.А. Гюнтер**, О.В. Попейко, Ю.С. Оводов // Биохимия. - 2007. - Т. 72. - № 9. - С. 1238-1247 (перечень ВАК), автора – 0.75 пл.
13. Гюнтер Е.А. Полисахариды клеточных культур *Silene vulgaris* / **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Прикл. биохим. микробиол. - 2007. - Т. 43. - № 1. - С. 94-101 (перечень ВАК), автора – 0.85 пл.
14. Гюнтер Е.А. Действие ультрафиолетового излучения на рост и полисахаридный состав каллусной культуры *Silene vulgaris* / **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Прикл. биохим. микробиол. - 2007. - Т. 43. - № 4. - С. 518-526 (перечень ВАК), автора – 0.85 пл.

15. Гюнтер Е.А. Продуцирование полисахаридов каллусными культурами ряски малой / **Е.А. Гюнтер**, О.В. Попейко, Ю.С. Оводов // Прикл. биохим. микробиол. - 2008. - Т. 44. - № 1. - С.117-122 (перечень ВАК), автора – 0.75 пл.
16. Гюнтер Е.А. Индукция β -1,3-глюканазы в каллусных культурах *in vitro* / **Е.А. Гюнтер**, О.М. Капустина, О.В. Попейко, Т.И. Челпанова, Э.А. Ефимцева, Ю.С. Оводов // Биохимия. - 2008. - Т. 73. - № 7. - С. 1023-1031 (перечень ВАК), автора – 0.5 пл.
17. Гюнтер Е.А. Действие ультрафиолета на строение и антиоксидантную активность силенана, пектина каллуса смолевки обыкновенной / **Е.А. Гюнтер**, М.Ф. Борисенков, Ю.С. Оводов // Прикл. биохим. микробиол. - 2009. - Т. 45. - № 4. - С. 424-428 (перечень ВАК), автора – 0.75 пл.
18. Гюнтер Е.А. Модифицированные арабиногалактаны каллусной культуры *Silene vulgaris* (М.) G. / **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Прикл. биохим. микробиол. - 2009. - Т. 45. - № 6. - С. 698-704 (перечень ВАК), автора – 0.85 пл.
19. Günter E.A. Action of β -galactosidase in medium on the *Lemna minor* (L.) callus polysaccharides / **E.A. Günter**, O.V. Popeyko, Yu.S. Ovodov // Carbohydr. Res. - 2009. - V. 344. - P. 2602-2605 (перечень ВАК), автора – 0.75 пл.
20. Гюнтер Е.А. Пектиновые вещества каллусной культуры *Silene vulgaris* (М.) G. / **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Прикл. биохим. микробиол. - 2011. - Т. 47. - № 1. - С. 90-94 (перечень ВАК), автора – 0.85 пл.
21. Günter E.A. Biotechnologic production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus / **E.A. Günter**, Yu.S. Ovodov // Biotech News Intern. - 2001. - V. 6. - № 3. - P. 14-15. - автора – 0.85 пл.
22. Бушнева О.А. Силенаны – полисахариды смолевки обыкновенной (*Silene vulgaris*) / О.А. Бушнева, Р.Г. Оводова, **Е.А. Гюнтер** (Мишарина) // Химия раст. сырья. - 1999. - № 1. - С. 27-32. – автора – 0.35 пл.
23. Гюнтер Е.А. Влияние регуляторов роста на клеточную культуру *Silene vulgaris* и на химические характеристики продуцируемых ею полисахаридов / **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Химия раст. сырья. - 2001. - № 2. - С. 57-62. – автора – 0.75 пл.
24. **Гюнтер Е.А.** Полисахариды из каллусной культуры *Lemna minor* L. // Химия раст. сырья. - 2001. - № 2. - С. 63-67. – автора – 1.0 пл.
25. **Гюнтер Е.А.** Культуры клеток нетрадиционных растений как продуценты полисахаридов // Аграрная Россия. - 2001. - № 6. - С. 73-74. – автора – 1.0 пл.
26. Гюнтер Е.А. Пектиновые полисахариды культур клеток *Silene vulgaris* / **Е.А. Гюнтер**, Ю.С. Оводов // Сборник научных трудов “Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты”. - 2002. - № 6. - С. 147-157. – автора – 0.85 пл.
27. Гюнтер Е.А. Полисахариды клеточных линий *Lemna minor* L. / **Е.А. Гюнтер**, О.В. Попейко, Ю.С. Оводов // Труды Коми НЦ УрО РАН “Химия и технология растительных веществ”. - 2005. - № 176. - С. 14-23. – автора – 0.75 пл.
28. Гюнтер Е.А. Каллусные культуры как продуценты полисахаридов / **Е.А. Гюнтер**, О.В. Попейко, О.М. Капустина, Ю.С. Оводов // Вестник биотехнологии. - 2005. - Т.1. - № 2. - С. 36-41. – автора – 0.7 пл.
29. Вислобоков А.И. Неспецифическая активация ионных каналов нейронов полисахаридами из *Tanacetum vulgare* и *Oberna behen* / А.И. Вислобоков, В.И. Прошева, К.Н. Мельников, А.Я. Полле, **Е.А. Гюнтер** // Психофармакол. биол. наркол. - 2006. - Т. 6. - Вып. 1-2. - С. 1171-1175. – автора – 0.2 пл.
30. Храмова Д.С. Действие лемнана, пектина из каллуса ряски малой *Lemna minor* L., на толерантность к белковому антигену / Д.С. Храмова, **Е.А. Гюнтер** // Вестник уральской мед. акад. науки. - 2006. - № 3-1. - С. 324-326. – автора – 0.5 пл.

31. Вислобоков А.И. Влияние арабиногалактана и пектина из каллуса смолевки обыкновенной *Silene vulgaris* на калиевые каналы нейрональной мембраны / А.И. Вислобоков, В.И. Прошева, **Е.А. Гюнтер**, К.Н. Мельников // Альманах клинической медицины. - 2008. - Т. XVII. - Ч. 2. - С. 41-43. – автора – 0.25 пл.
32. Вислобоков А.И. Мембранотропные эффекты растительных полисахаридов / А.И. Вислобоков, В.И. Прошева, **Е.А. Гюнтер**, П.А. Галенко-Ярошевский // Кубанский научн. мед. вестник. - 2009. - Т. 11. - № 8. - С. 24-29. – автора – 0.25 пл.
33. Михалева Н.Я. Влияние последовательного кислотного и ферментативного гидролиза на структуру и антиоксидантную активность пектинов / Н.Я. Михалева, М.Ф. Борисенков, **Е.А. Гюнтер**, О.В. Попейко, Ю.С. Оводов // Химия раст. сырья. - 2010. - № 3. - С. 29-36. – автора – 0.3 пл.

Монографии

1. Оводов Ю.С. Пектиновые вещества растений Европейского Севера России. / Ю.С. Оводов, В.В. Головченко, **Е.А. Гюнтер**, С.В. Попов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2009. - 112 с. Автора – 1.9 пл.

Патенты

1. **Гюнтер Е.А.**, Оводов Ю.С. Питательная среда для культивирования каллусной ткани *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. Патент РФ № 2169769 от 27.06.2001. БИ № 18, 2001. – автора – 0.85 пл.
2. **Гюнтер Е.А.**, Оводов Ю.С. Питательная среда для получения каллусной ткани *Lemna minor* L. Патент РФ № 2171840 от 10.08.2001. БИ № 22, 2001. – автора – 0.85 пл.
3. **Гюнтер Е.А.**, Оводов Ю.С. Питательная среда для получения каллусной ткани *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. Патент РФ № 2171841 от 10.08.2001. БИ № 22, 2001. – автора – 0.85 пл.
4. **Гюнтер Е.А.**, Оводов Ю.С. Способ получения пектиновых полисахаридов из биомассы культивируемых тканей растений. Патент РФ № 2175843 от 20.11.2001. БИ № 32, 2001. – автора – 0.85 пл.
5. Донцов А.Г., **Гюнтер Е.А.**, Способ подготовки пробы при определении содержания сахаров в агаризованных питательных средах методом ВЭЖХ на аминофазе. Патент РФ № 2205379 от 27.09.2003. БИ № 15, 2003. – автора – 0.5 пл.

Тезисы докладов

1. Günter E.A. Biotechnological production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus / **E.A. Günter**, Yu.S. Ovodov // Abstract of The World Congress on Biotechnology 2000. - Berlin, 2000. - V. 4. - P. 114. – автора – 0.07 пл.
2. **Гюнтер Е.А.** Полисахариды из каллусной культуры *Lemna minor* L. // Тез. докл. Всероссийской конференции "Химия и технология растительных веществ". - Сыктывкар, 2000. - С. 51. – автора – 0.1 пл.
3. **Гюнтер Е.А.** Культуры клеток нетрадиционных растений как продуценты полисахаридов // Тез. докл. 1-й Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создания функциональных продуктов». - Москва, 2001. - С. 250-251. – автора – 0.1 пл.
4. Günter E.A. Effect of calcium on biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture / **E.A. Günter**, Yu.S. Ovodov // Abstr. of 12th European Carbohydrate Symposium. - Grenoble, 2003. - P. 387. – автора – 0.07 пл.
5. **Гюнтер Е.А.** Регуляция биосинтеза полисахаридов в культуре клеток *Silene vulgaris* // Тез. докл. 7-й Пущинской школы-конференции молодых ученых. - Пущино, 2003. - С. 326. – автора – 0.1 пл.

6. Günter E.A. Polysaccharides of *Silene vulgaris* cell cultures and intact plant / **E.A. Günter**, Yu.S. Ovodov // Abstr. of 11th European Congress on Biotechnology. - Basel, 2003. - P. 153. – автора – 0.07 пл.
7. **Гюнтер Е.А.** Культуры клеток растений как продуценты полисахаридов // Тез. докл. Второго съезда Общества биотехнологов России. - Москва, 2004. - С. 61-62. – автора – 0.1 пл.
8. **Гюнтер Е.А.** Биотехнология пектиновых веществ с использованием клеточных культур // Тез. докл. IV Всероссийской конференции "Химия и технология растительных веществ". - Сыктывкар, 2006. - С. 15. – автора – 0.1 пл.
9. Günter E.A. Effect of macro-nutrients and ultraviolet on polysaccharide composition of *Silene vulgaris* cell culture / **E.A. Günter**, Yu.S. Ovodov // Abstr. 2006 EFFoST Annual Meeting/Total Food 2006 "Sustainability of the agri-food chain", 7-9 November, 2006. - Hague, 2006. - P.9.09. – автора – 0.07 пл.
10. **Гюнтер Е.А.** Влияние *Trichoderma harzianum* на полисахаридный состав клеточных стенок каллусной культуры смолевки // Тез. докл. Международной конференции «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». - Сыктывкар, 2007. - С. 160-161. – автора – 0.1 пл.
11. Günter, E.A. Chemical characterization and anti-inflammatory activity of pectin from the *Tanacetum vulgare* L. callus culture / **E.A. Günter**, P.A. Markov, Yu.S. Ovodov // Abstr. of the Central European Congress of Life Sciences "Eurobiotech 2008", Krakow, 17-19 October 2008. - Krakow, 2008. - P. 51. – автора – 0.05 пл.
12. Капустина О.М. Каллусная культура смолевки обыкновенной как модельный объект для изучения взаимодействия растений и фитопатогенных грибов / О.М. Капустина, **Е.А. Гюнтер** // Материалы V Межрегиональной конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». - Саратов, 2010. - С. 115. – автора – 0.07 пл.
13. Гюнтер Е.А. Влияние агробактериальных генов *rol* на содержание полисахаридов в культурах трансгенных клеток *Rubia cordifolia* / **Е.А. Гюнтер**, О.В. Попейко, Ю.Н. Шкрыль, В.П. Булгаков, Г.Н. Веремейчик, Ю.С. Оводов // Тез. докл. VII Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ». - Сыктывкар, 2011. - С. 48. – автора – 0.03 пл.
14. **Гюнтер Е.А.** Пектиновые вещества культур клеток растений // Тез. докл. I Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология». - Казань, 2012. - С. 29. – автора – 0.1 пл.

Автор выражает искреннюю благодарность научным консультантам академику Юрию Семеновичу Оводову и д.б.н., доценту Сергею Владимировичу Попову за всестороннюю поддержку, ценные советы и консультации. Автор благодарит сотрудников Отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН за помощь в выполнении и обсуждении работы.